



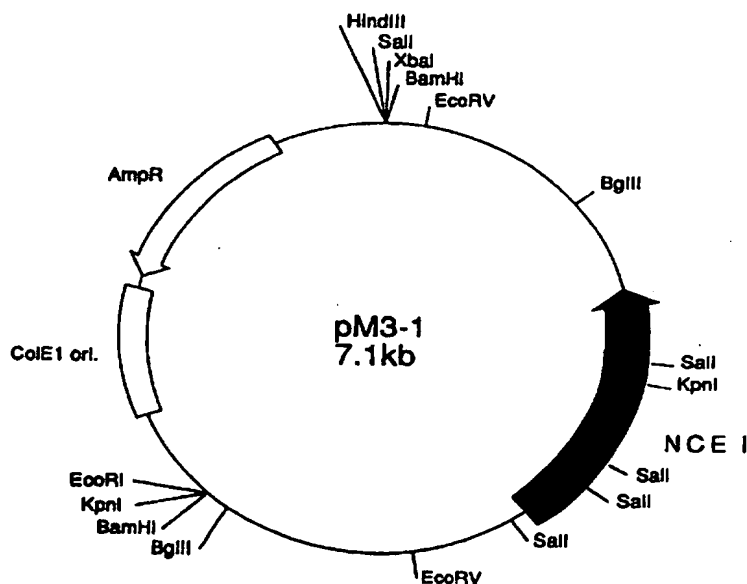
<p>(51) 国際特許分類 C12N 15/74, 1/21, C12P 21/02, C07K 14/37</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/03667</p> <p>(43) 国際公開日 1998年1月29日(29.01.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02560</p> <p>(22) 国際出願日 1997年7月24日(24.07.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/195070 1996年7月24日(24.07.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製菓株式会社(MEIJ SEIKA KAISHA, LTD.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 守屋達樹(MORIYA, Tatsuki)(JP/JP) 青柳 薫(AOYAGI, Kaoru)(JP/JP) 隅田奈緒美(SUMIDA, Naomi)(JP/JP) 渡辺 学(WATANABE, Manabu)(JP/JP) 村上 健(MURAKAMI, Takeshi)(JP/JP) 〒250-01 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p>	<p>村島弘一郎(MURASHIMA, Kouichirou)(JP/JP) 浜谷 徹(HAMAYA, Toru)(JP/JP) 古賀仁一郎(KOGA, Jinichiro)(JP/JP) 河野敏明(KONO, Toshiaki)(JP/JP) 〒350-02 埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 生物科学研究所内 Saitama, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title: SYSTEMS FOR THE MASS PRODUCTION OF PROTEINS OR PEPTIDES BY MICROORGANISMS OF THE GENUS HUMICOLA

(54) 発明の名称 フミコーラ属微生物におけるタンパク質またはペプチドの大量生産系

(57) Abstract

Expression systems enabling the mass production of proteins by microorganisms belonging to the genus *Humicola*, in particular, *H. insolens*, among all, host/vector systems and methods for producing proteins with the use of the same. Expression vectors containing the regulatory sequences, i.e., the promoters, signal sequences and terminators of cellulase NCE1 or NCE2 genes originating in *H. insolens* are constructed and utilized. The use of these expression vectors makes it possible to produce, for example, cellulase NCE4 at a high efficiency of about 4.5 kg or more of the product per liter of the culture broth of *H. insolens*.



(57) 要約

フミコーラ属に属する微生物、とりわけフミコーラ・インソレンスにおけるタンパク質の大量生産を可能にする発現系、とりわけ宿主-ベクター系およびそれを利用したタンパク質の製造方法が開示されている。フミコーラ・インソレンス由来のセルラーゼNCE 1遺伝子またはNCE 2遺伝子の制御配列、すなわちプロモーター、シグナル配列、およびターミネーターを含んだ発現ベクターを構築し、それを利用する。この発現ベクターにより、例えばセルラーゼNCE 4を、フミコーラ・インソレンスにおいて、培養液1リットルあたり約4.5 g以上と極めて効率よく生産することができる。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KR	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LA	ラオス				
DK	デンマーク						

## 明 細 書

## フミコーラ属微生物におけるタンパク質またはペプチドの大量生産系

## 〔発明の背景〕

発明の分野

本発明は、フミコーラ属に属する微生物、とりわけフミコーラ・インソレンス (*Humicola insolens*) において、タンパク質またはペプチドを大量発現または大量分泌させる生産系に関する。

背景技術

糸状菌は、タンパク質を菌体外に分泌することが知られている。よって、糸状菌について、タンパク質を効率よく生産させるための高生産細胞や培養方法等が検討され、開発されてきた。

その主要なものとしては、UV照射、変異誘導剤等により、人工突然変異株を作出し、それらの中から目的とするタンパク質を多量に生産する株を選抜するという手法が挙げられる。

しかしこの手法は、複数のタンパク質の協調作用により活性が発現される様な酵素の発現およびその特性を向上させたい場合には利用が難しくなる。更に、生育に悪影響を及ぼす例えば致死性のタンパク質等を生産する場合には、目的タンパク質を生産する細胞にいかなる変異処理を用いても生産性の向上が図れないことが多く見受けられる。

一方、最近になって遺伝子組み換えの技術を用いて目的タンパク質を生産させる方法が検討され、一部の糸状菌においては、異種由来のタンパク質、または、同種において微量発現しているタンパク質を大量に生産することが可能となった。例えば、*Aspergillus nidulans* (G.L.Gray, et al., Gene, 48, 41, 1986)、

*Aspergillus oryzae* (T. Christensen, et al., Bio/Technology, 6, 1419, 1988)、*Trichoderma reesei* (Taina Karhunen, et al., Mol. Gen. Genet. 241, 515-522, 1993)、*Trichoderma viride* (C. Cheng, et al., Agric. Biol. Chem., 55, 1817, 1991) 等において成功しており、その生産量は、培養液 1 L 当たり 1.0 ~ 3.3 g 程度である。

好温性糸状菌 *フミコーラ・インソレンス* (*Humicola insolens*) も優れたタンパク質分泌能を有する。また、*フミコーラ・インソレンス* は、種々の産業上有用なセルラーゼを産生することも知られている (WO 91/17243 号公報 (特表平 5-509223 号公報))。

しかしながら、*フミコーラ・インソレンス* の全分泌タンパク質における有用成分はわずか数%程度である。これら微量有用成分を大量発現、大量分泌させる方法を確認すれば、最終産物の能力は飛躍的に向上する。また、*フミコーラ・インソレンス* において異種由来の遺伝子を大量発現する方法を確認すれば、種々の酵素および有用タンパク質を単一の方法で生産でき、より安価な提供が可能となる。さらに、有用タンパク質の生産宿主として *フミコーラ・インソレンス* は、好温性糸状菌であることから、至適培養温度が 37℃ 付近であり、培養の際、他の雑菌の汚染を受けにくいという利点がある。

一方、*フミコーラ・インソレンス* においても、本発明者等の一部によって、特開平 8-56663 号公報に記載されているように、形質転換系が確立され、遺伝子組み換えの技術の使用が可能となった。

しかし、*フミコーラ・インソレンス* に関し、目的タンパク質を高レベルで発現、分泌できるような有効な発現ベクター系の開発が依然として求められていたといえる。

## 〔発明の概要〕

本発明者らは、今般、フミコーラ属に属する微生物、とりわけフミコーラ・インソレンスにおける目的タンパク質の大量生産方法を確立した。

従って、本発明はフミコーラ属に属する微生物、とりわけフミコーラ・インソレンスにおけるタンパク質の大量生産を可能にする発現系、とりわけ宿主－ベクター系およびそれを利用したタンパク質の製造方法の提供をその目的としている。

本発明の好ましい態様によれば、目的タンパク質の生産性は親株の10～16倍となり、またその生産量は培養液1リットルあたり約4.5gに達する極めて効率のよいタンパク質の生産系が提供される。

## 〔図面の簡単な説明〕

図1は、プラスミドpM3-1の制限酵素地図である。

図2は、プラスミドpM14-1の制限酵素地図である。

図3は、プラスミドベクターpMKD01の制限酵素地図である。

図4は、プラスミドベクターpEGD01の制限酵素地図である。

図5は、プラスミドベクターpIED02の制限酵素地図である。

## 〔発明の具体的説明〕

微生物の寄託

図1に記載の地図で表されるプラスミドpM3-1で形質転換された大腸菌JM109株は、FERM BP-5971（原寄託：FERM P-14459、原寄託日：1994年8月3日）の受託番号のもと通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1-1-3）に寄託されている。

図2に記載の地図で表されるプラスミドpM14-1で形質転換された大腸菌JM109株は、FERM BP-5972（原寄託：FERM P-1458

5. 原寄託日：1994年10月18日)の受託番号のもと通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

本発明による発現ベクターpMKD01で形質転換された大腸菌JM109株は、FERM BP-5974 (原寄託：FERM P-15730、現寄託日：1996年7月12日)の受託番号のもと通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

本発明による発現ベクターpEGD01で形質転換された大腸菌JM109株は、FERM BP-5973 (原寄託：FERM P-15729、原寄託日：1996年7月12日)の受託番号のもと通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

本発明による発現ベクターpIED02で形質転換された大腸菌JM109株は、FERM BP-5975 (原寄託：FERM P-15731、原寄託日：1996年7月12日)の受託番号のもと通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

本発明による発現ベクターpNCE4Sa1で形質転換された大腸菌JM109株は、FERM BP-5976 (原寄託：FERM P-15732、原寄託日：1996年7月12日)の受託番号のもと通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

本発明による発現ベクターの宿主となりうるフミコーラ・インソレンスMN200-1は、FERM BP-5977 (原寄託：FERM P-15736、原寄託日：1996年7月15日)の受託番号のもと通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

#### 定 義

本明細書において、タンパク質およびペプチドは特に断らない限り、同義に用いることとする。また、本明細書において、改変配列とは、塩基配列またはアミ

ノ酸配列において、一〜数個の塩基またはアミノ酸の挿入、置換または欠失、もしくはその一方または両末端への付加がなされたものを意味する。

#### フミコーラ・インソレンスにおける制御配列

本発明におけるフミコーラ属に属する微生物における発現系にあっては、フミコーラ・インソレンス由来の制御配列を用いる。本発明において制御配列とは、プロモーター、シグナル配列、およびターミネーターからなる群から選ばれる少なくとも一つを意味する。

本発明による制御配列とは、好ましくは特開平 8-56663 号公報に記載のフミコーラ・インソレンス由来のセルラーゼ NCE 1 遺伝子の制御配列、さらに特開平 8-126492 号公報に記載のフミコーラ・インソレンス由来のセルラーゼ NCE 2 遺伝子の制御配列である。より具体的には、FERM BP-5971 および FERM BP-5972 のもと寄託されている菌株中のプラスミド pM3-1 およびプラスミド pM14-1 内にある、NCE 1 および 2 の制御配列である。

本発明において好ましいプロモーター配列の例としては、図 1 の地図で表されるプラスミド pM3-1 中の、NCE 1 遺伝子の N 末端から上流の約 1500 bp までの領域中に存在する配列、例えば図中の NCE 1 遺伝子の N 末端から上流の Bgl II サイトまでの配列が挙げられる。

また、本発明において好ましいプロモーター配列の別の例としては、図 2 の地図で表されるプラスミド pM14-1 中の、NCE 2 遺伝子の N 末端から上流の約 1500 bp までの領域中に存在する配列、例えば図中の NCE 2 遺伝子の N 末端から上流の EcoRI サイトまでの配列が挙げられる。

さらに、本発明によるプロモーター配列には、これら領域の全配列のみならず、高プロモーター活性を保持するその改変配列も含まれる。本発明において、高プロモーター活性とは、後記する NCE 4 遺伝子の発現において、高発現を実現

する強いプロモーター活性を意味し、より具体的には、培地 1 リットルあたり 2.0 g、好ましくは 4.0 g、より好ましくは 4.5 g の NCE 4 の発現を実現するプロモーター活性を意味するものとする。後記する実施例に記載の知見、FERM BP-5971 および FERM BP-5972 のもと寄託されている菌株、および図 1 または 2 の地図が与えられた当業者であれば、そのような改変配列が存在することは容易に予測でき、また容易に製造することが可能であることは明らかである。

また、本発明において好ましいシグナル配列の例としては、セルラーゼ NCE 1 または 2 のシグナル配列が挙げられる。より具体的には配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の -22 から -1 までの配列をコードする塩基配列、および配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の -23 から -1 までの配列をコードする塩基配列が挙げられる。更に本発明には、その改変配列であって、依然としてシグナル配列活性を保持するアミノ酸配列をコードするものも包含される。このような改変配列についても、後記する実施例に記載の知見、FERM BP-5971 および FERM BP-5972 のもと寄託されている菌株、および図 1 または 2 の地図が与えられた当業者であれば、そのような改変配列が存在することは容易に予測でき、また容易に製造することが可能であることは明らかである。

なお、これら配列の実際の利用にあたり上記のシグナル配列に加えてさらに NCE 1 または 2 の N 末端側のいくつかのアミノ酸が付加されてもよいことは当業者に明らかである。すなわち、これらシグナル配列の利用にあたり、目的タンパク質が、NCE 1 または 2 の N 末端側のいくつかのアミノ酸からなるペプチドとの融合タンパク質、さらには NCE 1 または NCE 2 との融合タンパク質として得られてもよい。

さらに、本発明において好ましいターミネーター配列としては、図 1 の地図で表されるプラスミド pM3-1 中の、NCE 1 遺伝子の C 末端から下流の約 14



00bpまでの領域中に存在する配列、例えばNCE1遺伝子のC末端から下流のBglIIサイトまでの配列が挙げられる。また、別の例としては、図2の地図で表されるプラスミドpM14-1中の、NCE2遺伝子のC末端から下流の約500bpまでの領域中に存在する配列、例えば例えばNCE1遺伝子のC末端から下流のBglIIサイトまでの配列が挙げられる。

さらに、本発明によるターミネーター配列には、これら領域の全配列のみならず、そのターミネーター活性を保持する改変配列も含まれる。

これら制御配列、とりわけNCE1またはNCE2のプロモーター配列は、NCE4遺伝子を極めて高効率で発現させる。従って、本発明の好ましい態様によれば、NCE4遺伝子の発現に好ましく用いられる制御配列、とりわけNCE4遺伝子の発現に好ましく用いられるプロモーター配列が提供される。本発明の好ましい態様によれば、セルラーゼNCE4の生産性は、この酵素の由来である親株における生産性の10～16倍となり、またその生産量は培養液1リットルあたり2.0g、好ましくは4.0g、より好ましくは約4.5gに達する。

#### 発現ベクターおよび宿主

本発明によれば、上記制御配列を用いて目的タンパク質を発現するための発現ベクターが提供される。

本発明による発現ベクターは、その第一の態様によれば、上記制御配列と、場合によって遺伝子マーカーとを含んでなるものである。さらに、本発明による発現ベクターは、第一の態様の発現ベクターに、さらにその制御配列に作動可能に連結された目的タンパク質をコードする塩基配列を含んでなるものである。従って、上記した本発明によるプロモーター、シグナル配列、およびターミネーターからなる群から選ばれる少なくとも一つを含んでなる発現ベクターは本発明の範囲に包含されるものである。

前記したように、本発明によるプロモーター配列は極めて有用性の高いもので

あることから、本発明の好ましい態様によれば、本発明によるプロモーター配列を少なくとも含んでなる発現ベクターが提供される。この発現ベクターにあって、シグナル配列、ターミネーター配列は本発明によるシグナル配列およびターミネーター配列以外のものであってもよいが、上記した上記本発明によるシグナル配列およびターミネーター配列の利用が好ましい。これらベクターの具体例としては、後記する実施例において構築された発現ベクター pMKD01、pEGD01、および p1ED02 から NEC3 および NCE4 遺伝子を除いた形態のベクターが挙げられる。

本発明による発現ベクターは、宿主細胞において複製可能なベクター、例えばプラスミドを基本に構築されるのが好ましい。そのようなベクターとして、大腸菌で複製可能なベクターである、pUC Vector、pTV Vector、pBluescript、pBR322などが挙げられる。本発明によるベクターの構築に必要な手法は、遺伝子組み替えの分野において慣用されている方法を用いることができる。

また遺伝子マーカーは、形質転換体の選択の手法に応じて適宜選択されてよいが、例えば薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を利用することができる。本発明に用いる薬剤耐性遺伝子は、宿主細胞が感受性を示す薬剤に関するものならば限定されないが、例えば、宿主としてフミコーラ・インソレンスを用いる場合、*Streptomyces rimofaciens* 由来のデストマイシン耐性遺伝子、*Escherichia coli* 由来のハイグロマイシンB耐性遺伝子、*Streptococcus hindustanus* 由来のブレオマイシン耐性遺伝子、*Streptomyces hygroscopicus* 由来のビアラフォス耐性遺伝子を好ましく用いることができる。

本発明の好ましい態様によれば、公知の方法により、*Aspergillus nidulans* 由来 trp C 遺伝子のプロモーターとターミネーター (Mullaney, E. J. et al., Mol. Gen. Genet. 199:37-45, 1985) が得られ、これを用いて、デストマイシン耐性遺伝子 (特開昭59-175889) を発現可能にしたカセットを利用するのが好ましい。

本発明による発現ベクターは、種々の目的タンパク質またはペプチドの発現生産に利用することができる。本発明において目的タンパク質またはペプチドとは、フミコーラ・インソレンスに存在しないいわゆる外来タンパク質のみならず、フミコーラ・インソレンスにおいて発現してはいるがその量が微量であるタンパク質をも意味するものとする。例えば、本発明による発現ベクターにおける目的タンパク質をコードする遺伝子としては、セルラーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ、フィターゼ等産業上有用なタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。また、これらを人為的に改良した遺伝子についても同様に目的タンパク質とすることができる。

本発明による発現ベクターは、宿主としてフミコーラ属に属する微生物と組み合わせられて発現系とされる。本発明の好ましい態様によれば、フミコーラ属に属する微生物としてフミコーラ・インソレンスを利用する。

#### NCE 4 遺伝子

本発明の好ましい態様によれば、本発明による発現系は、フミコーラ・インソレンス由来のセルラーゼNCE 4またはそれらの改変タンパク質を目的タンパク質として、その生産のために好ましく用いることができる。ここで、フミコーラ・インソレンス由来のセルラーゼNCE 4とは、配列番号3に記載のタンパク質を意味する。これは後記する実施例に記載の通り、今般、本発明者等によって単離されたセルラーゼ酵素である。なおここで、改変タンパク質とは、上記タンパク質のアミノ酸配列において、アミノ酸の付加、挿入、削除、欠失、または置換などの改変が生じたタンパク質であって、依然としてセルラーゼNCE 4と同様のセルラーゼ活性、とりわけエンドグルカナーゼ活性を保持するものを意味するものとする。

本発明の好ましい態様によれば、これらセルラーゼNCE 4の発現系として好ましいベクターの具体例としては、後記する実施例によって構築された発現ベク

ターpMKD01、pEGD01、またはpIED02が挙げられる。

本発明による発現ベクターによる宿主細胞の形質転換は、遺伝子組み替えの分野で慣用されている手法を用いることができ、例えば、特開平8-56663号公報に記載の方法に準じて実施することができる。また、エレクトロポレーションによって実施されてもよい。

### 目的タンパク質の生産

本発明による目的タンパク質の生産は、上記した本発明による発現ベクターで形質転換された宿主細胞を適当な培地中で培養し、培養物から目的タンパク質またはペプチドを採取することによって実施される。

本発明の好ましい態様によれば、目的タンパク質の生産性は親株の10～16倍となり、またその生産量は培養液1リットルあたり2.0g、好ましくは4.0g、より好ましくは約4.5gに達する極めて効率のよいタンパク質の生産系が提供される。例えば、宿主細胞がフミコーラ・インソレンスである場合、その培養液1リットルあたり2.0g、好ましくは4.0g、より好ましくは4.5g以上の目的タンパク質を生産することができる。この量は、従来知られたタンパク質の発現系と比較して、極めて多量である。このことは、本発明による目的タンパク質の発現系が極めて高い有用性を有していることを示している。

例えば、目的タンパク質がセルラーゼNCE3またはNCE4である場合、これら酵素は本来的に高活性であるが、それを更に大量に生産することができる。その結果、セルロース含有繊維の毛羽除去、減量加工、およびデニム染めセルロース含有繊維の脱色加工などに有用なセルラーゼ調製物を効率よく生産することが可能となるとの利点が得られる。

本発明による目的タンパク質の生産法において、形質転換体の培養は、慣用の成分、例えば炭素原、窒素原、無機塩、増殖因子成分などを含む液体培地で、好氣的条件での培養法、振盪培養法、電気攪拌培養法または深部培養法により行う

ことができる。培地のpHは例えば7～8程度である。培養は宿主細胞がフミコーラ・インソレンスである場合、フミコーラ・インソレンスの培養に慣用される通常の条件、例えば15℃～45℃、好ましくは35℃～40℃、培養時間は24～240時間程度の条件で行うことができる。

本発明によって得られるタンパク質あるいはペプチドの培養物からの回収にあたっては、その性状を利用した通常の分離手段、例えば溶剤抽出法、イオン交換樹脂法、吸着または分配カラムクロマト法、ゲル濾過法、透析法、沈殿法等を単独で、または適宜組み合わせる用いることができる。

#### [実施例]

本発明を以下の実施例によって詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例A1：フミコーラ・インソレンスからのテンセル毛羽除去に活性を有する成分の単離精製

フミコーラ・インソレンスMN200-1を、(N)培地(5.0%アビセル、2.0%酵母エキス、0.1%ポリペプトン、0.03%塩化カルシウム、0.03%硫酸マグネシウム、pH6.8)中、37℃で培養した。7日間培養の後、得られた培養液を7000rpmで20分間遠心することにより菌体を除き、培養上清液を粗精製セルラーゼ調製液とした。

この粗精製セルラーゼ調製液を疎水クロマトグラフィー(Phenyl-Sepharose High Performance16/100、ファルマシアバイオテク社製)に供し、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)中、1-0Mの濃度勾配をかけた硫酸アンモニウム溶液で溶出し、分画した。このうち、0.1-0Mの濃度勾配のときに得られた画分にテンセル毛羽除去活性が強く認められたので、その画分を再び、疎水クロマトグラフィー(Phenyl-Sepharose High Performance16/100)に供し、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)中、0.4-0Mの濃度勾配をかけた硫酸アンモニウム

溶液で溶出し、活性画分を分取した。

次に、その画分を逆相クロマトグラフィー (Source15 IS0、ファルマシアバイオテク社製) に供し、50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、1-0 Mの濃度勾配をかけた硫酸アンモニウム溶液で溶出し、分画した。このうち、0 Mの濃度のときに得られた画分にテンセル毛羽除去活性が強く認められたので、その画分を逆相クロマトグラフィー (Source 15 PHE、ファルマシアバイオテク社製) に供し、50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、1-0 Mの濃度勾配をかけた硫酸アンモニウム溶液で溶出し、テンセル毛羽除去活性の強い画分を精製酵素NCE 4として単離した。このNCE 4はSDS-PAGEにおいて分子量43 kDaの単一なバンドを示した。

#### 実施例A2：セルラーゼNCE 4の部分アミノ酸配列

##### (1) N末端アミノ酸残基の同定

実施例1において精製したタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定するため、FPLCシステム (ファルマシアバイオテク社製) でカラムクロマトグラフィーを行い (カラム: RESOURCE (商品名) RPC 3ml、0.1%のTFAを含む5%~60%アセトニトリルグラジェント)、主要なピークを分取した。

これを凍結乾燥した後、少量の水に溶解し、8%Gel SDS-PAGE mini (テフコ社製) を用いて電気泳動した。マルチフォーII電気泳動装置 (ファルマシアバイオテク社製) を用いて、これをPVDF膜 (ミリポア社製) に、タンパク質を電氣的にうつしとり、コマジーブリリアントブルーR-250 (ナカライテスク社製) で染色した後、脱色し、水で洗浄し、風乾した。ここから分子量43 kDaのタンパク質がプロットされた部分を切り出し、これをプロテインシーケンサーModel 492 (パーキンエルマー社製) に供し、N末端側アミノ酸配列を15残基決定した。得られた配列は以下の通りであった。

N 末端アミノ酸配列 : Ala-Asp-Gly-Lys-Ser-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp-(Cys)-(Cys)  
-Lys-Pro-Ser (15残基)

(2) ペプチドマッピング

前記(1)のFPLCによって精製されたタンパク質を凍結乾燥後、100 mM重炭酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0)に溶解した。タンパク質に対し約1/20モル量のトリプシン(プロメガ社製)を添加し、37℃で、48時間反応させた。この分解産物をModel 172  $\mu$ プレパラティブHPLCシステム(パーキンエルマ社製)でカラムクロマトグラフィーを行い(カラム: C8 220  $\times$  2.1 mm、0.1% TFA、0%アセトニトリル $\sim$ 0.085% TFA、35%アセトニトリルグラジェント)、3種のペプチドを分取した。得られたペプチド断片のアミノ酸配列を前述のプロテインシーケンサーにより決定した。その結果は、以下の通りであった。

TP-1 : Tyr-Gly-Gly-Ile-Ser-Ser (6 残基)

TP-2 : Phe-Pro-Asp-Ala-Leu-Lys (6 残基)

TP-3 : Phe-Asp-Trp-Phe-Lys-Asn-Ala-Asp-Asn-Pro-Ser-Phe-Ser-Phe-Arg

\* \* \* \* \*

(15残基)

これらN末端アミノ酸配列およびペプチドマッピングによって得られたアミノ酸配列は、WO 91/17243号公報(特表平5-509223号公報)に記載されているフミコーラ・インソレンスDSM1800から得られた43 KDa エンドグルカナーゼのアミノ酸配列と相同性を示すことから、同タンパク質はセルラーゼの一種であることが強く示唆された。

また、上記配列をProtein Identification Resource (PIR) R44.0, March, 1995、またはSWISS-PROT R31.0, March 1995 に登録されている配列と比較したところ、相同性を示す配列はあるものの、同一ではなく、新規なタンパク質である

ことが明らかとなった。

#### 実施例 A 3 : ゲノム DNA ライブラリーの作製

ゲノム DNA の単離は Horiuchi らの方法 (Hiroyuki Horiuchi et al., J. Bacteriol., 170:272-278, 1988) に従った。

まず、フミコーラ・インソレンス MN 200-1 を前述 (N) 培地中、37℃ で培養した。2 日間培養の後、遠心分離 (3500 rpm、10 分) によって菌体を回収した。得られた菌体をフェノール処理、プロテイナーゼ K、およびリボヌクレアーゼ A 処理、さらにポリエチレングリコール (PEG) 沈殿化によりゲノム DNA を得た。

つぎに、フミコーラ・インソレンスゲノム DNA を Sau3A I により消化し、アガロースゲル電気泳動によって、9~23 kbp の範囲で部分的に分解されたことを確認した後、これをエタノール沈殿によって回収した。この DNA 断片をファージベクター、EMBL3 クローニングキット (ストラタジーン社製) の BamH I アームに T4 リガーゼ (東洋紡績社製) を用いて連結させた。これをエタノール沈殿後、TE (10 mM トリス塩酸 (pH 8.0)、1 mM EDTA) 緩衝液に溶解した。

連結混合物の全量を Hohn, B. の方法 (Hohn, B. Methods Enzymol., 68:299-309, 1979) に記載されている様に凍結したパッケージ成分およびギガパック II パッケージングキット (ストラタジーン社製) を用いて、ラムダヘッドにパッケージし、得られたファージを大腸菌 LE 392 株に感染させた。この方法により得られた  $5 \times 10^4$  個のファージライブラリーを用いて目的遺伝子のクローニングを行った。

#### 実施例 A 4 : PCR 法による長鎖プロープの作製

DNA プロープとして、フミコーラ・インソレンスの全 DNA を鋳型に PCR 法により増幅されたロングプロープを作製し、これを用いた。



各プライマーは、N末端およびペプチドTP-3において\*で示したアミノ酸に対応するDNAを合成した。作製した合成オリゴヌクレオチドの配列は以下に示される通りであった。

NCE4N1: 5'-GCXGA(CT)GGXAA(AG)TC(AGCT)AC-3' (17mer)

NCE4N2: 5' GCXGA(CT)GGXAA(AG)AG(CT)AC-3' (17mer)

NCE4C: 5'-CXGC(AG)TT(CT)TT(AG)AACCA(AG)TC-3' (19mer)

(X: イノシン)

PCR反応は以下の条件で行った。まず、フミコーラ・インソレンスゲノムDNA 1  $\mu$ g に対し、プライマーとしてNCE4N1、NCE4C 各 1  $\mu$ M 加えたもの、NCE4N2、NCE4C 各 1  $\mu$ M 加えたものの2組のチューブを作製し、これらを、dNTP 存在下、95℃、5分間熱変性を行った。その後、Taq ポリメラーゼ（リコンビナントTaq、宝酒造社製）を加え、94℃1分間、45℃2分間、72℃3分間の反応条件を25回繰り返すことにより増幅した。その結果、プライマーとしてNCE4N1、NCE4C を用いた場合のみ、約750bpのDNAが増幅された。これを以降のスクリーニングのプロープとして用いた。

#### 実施例A5：セルラーゼ成分NCE4遺伝子のクローニング

##### (1) プラークハイブリダイゼーションによるスクリーニング

PCR法により増幅させた約750bpのDNA断片100ngを、あらかじめECL ダイレクトDNA/RNA ラベリング検出システム（アマシャム社製）により、標識化しておいた。

実施例2に記載の方法に準じて作製したファージプラークは、ハイボンドN+ナイロントランスファーマンブラン（アマシャム社製）にうつしとり、0.4N水酸化ナトリウムで変性した後、5倍濃度SSC（15mMクエン酸三ナトリウム、150mM塩化ナトリウム）で洗浄し、乾燥させDNAを固定した。キットの方法に従って、1時間のプレハイブリダイゼーション（42℃）の後、先の標識化

したプローブを添加し、4時間（42℃）ハイブリダイゼーションを行った。ラベルの洗浄は前述キットの方法に従った。まず、0.4% SDS、6M尿素添加0.5倍濃度SSCにより42℃で20分間の洗浄を2回繰り返し、次に2倍濃度SSCにより室温で5分間の洗浄を2回行った。

プローブの洗浄を行ったナイロン膜は、添付されている検出溶液に1分間浸したあと、ハイパーフィルム-ECL（アマシャム社製）に感光させ、4個の陽性クローンを得た。

### （2）ファージDNAの調製

E. coli LE392にファージを感染させ、8時間後ファージ粒子を集め、Grossbergerの方法（Grossberger, D., Nucleic Acids. Res. 15:6737, 1987）により、プロテイナーゼKおよびフェノール処理後、エタノール沈殿により、ファージDNAを分離した。

### （3）目的遺伝子のサブクローニング

4種のファージDNAをSal Iで切断し、アガロース電気泳動に供した。

DNAをSouthernの方法（Southern, E. M., J. Mol. Biol. 98:503-517, 1975）により、ナイロンメンブランにうつしとり、前記（1）のブランクハイブリダイゼーションと同一の条件で、約750bpのプローブを用いハイブリダイズさせ、5.2kbpの目的遺伝子を含むDNA断片を検出した。その結果、4種のファージDNAが同一サイズのSal I断片を有していた。

この5.2kbpのDNA断片をセファグラスバンドプレップキット（ファルマシアバイオテク社製）を用いて分離し、E. coli JM109を用いプラスミドpUC119のSal I サイトにサブクローニングを行った。得られたプラスミドをpNCE4Salとした。

## 実施例A6：塩基配列の決定

### (1) ゲノムDNAの塩基配列解析

塩基配列決定は以下の様に実施した。

塩基配列解析装置は、A.L.F. DNAシーケンサーII（ファルマシアバイオテク社製）を用いた。シーケンシングゲルとしては、レディミックスゲル（ファルマシアバイオテク社製）または、ハイドロリンクロングレンジャー（FMC社製）として入手可能なアクリルアミド担体を使用した。ゲル作成用各種試薬（N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン、尿素、過硫酸アンモニウム）としては、A.L.F. グレードの試薬（ファルマシアバイオテク社製）を用いた。塩基配列解読反応は、オートリードシーケンシングキット（ファルマシアバイオテク社製）を用いた。ゲル作製条件、反応条件と泳動条件の各々は、各説明書の詳細を参照し、設定した。

テンプレートDNAであるpNCE4Salを、10 $\mu$ gの2M水酸化ナトリウムでアルカリ変性した後、オートリードシーケンシングキット添付のユニバーサルプライマーとアニーリングさせ、伸長反応を行った。反応産物をシーケンサーで解読したところ、546bpの塩基配列が判明した。この結果から、MNEG01なるFITC標識シーケンシングプライマーを作製し、pNCE4Salに対して反応させ、さらに解読を進めた。得られた結果から、さらに次のプライマーを作製してゆき、解読を進めた結果、NCE4の全長が解読された。作製したFITC標識シーケンシングプライマーは以下に示される通りであった。

MNEG-01: 5'-GTGATGAGGGCTGGCGACAGGCC-3' (23mer)

MNEG-02: 5'-CTGCCACCTCTATTGCCGGCAGC-3' (23mer)

MNEG-03: 5'-CCCGACGCCCTCAAGCCCGGCTG-3' (23mer)

MNEG-04: 5'-GGCTGGAGCGGCTGCACCACCTG-3' (23mer)

## (2) 塩基配列決定

上記(1)の結果をもとに、MNEG-05 ~MNEG-08 なるFITC標識シーケンシングプライマーDNAを合成した。作製したFITC標識シーケンシングプライマーは以下に示される通りであった。

MNEG-05: 5'-GACCTGACGGAAGCTGAAGCTCG-3' (23mer)

MNEG-06: 5'-AGCAGTGCAGCCGCTGGGAGTCG-3' (23mer)

MNEG-07: 5'-TGGCAGATGAGGACGTGGTGTG-3' (23mer)

MNEG-08: 5'-CGCAGCCGGACTTGGCGTCGAAG-3' (23mer)

これらプライマーとpNCE4Salとのオートリードシーケンシングキットによる反応を行った。まず、10  $\mu$ gのプラスミドをアルカリ変性し、これを各々のプライマーとアニーリングし、T7ポリメラーゼで反応させた。その結果、SalI断片の内、1257bpの塩基配列が決定できた。その配列は配列番号3に示される通りであった。

### 実施例A7:イントロンの決定

イントロンの決定には、フミコーラ・インソレンスMN200-1からmRNAを調製し、逆転写酵素によりcDNAを合成し、これとゲノムの塩基配列を比較し同領域を判定した。

#### (1) 全RNAの調製

フミコーラ・インソレンスMN200-1をセルラーゼ誘導培地、好ましくは前述(N)培地において2日間培養し、菌体を遠心分離(3500rpm、10分)により回収した。そのうち2gの菌体を滅菌水で洗浄し、液体窒素で凍結したままブレンダー(日本精機社製ホモジナイザーAM-3)で粉碎した。これを4Mグアニジンチオシアン酸塩を含む変性溶液10ml(4Mグアニジンチオシアン酸塩、25mMクエン酸三ナトリウム、0.5%N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、0.1Mメルカプトエタノール)に懸濁した。室温で数分間攪拌の後、

1 ml の 2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.5) で中和し、10 ml の TE 飽和フェノールを加えさらに攪拌した。これに 2 ml のクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) を加え、よく攪拌した後、遠心分離 (3500 rpm、10分) によりフェノールで変性した菌体成分を除去した。上層 (水層) を吸い取り、10 ml のイソプロパノールで核酸を沈殿化した。同沈殿を遠心分離 (3500 rpm、10分) して核酸として回収し、70%エタノール-水で再遠心分離により沈殿を洗った。

この沈殿を 3.5 ml の TE に溶解の後、溶液に 880  $\mu$ l の 10 M 塩化リチウム溶液を加え、5℃で2時間冷蔵の後、遠心分離 (12000 rpm、10分) により沈殿を回収した。同沈殿は 70%エタノールで洗い、これを全 RNA 画分とした。収量は 2.7 mg、収率は 0.14% であった。

#### (2) ポリ A テイル<sup>+</sup> RNA (= mRNA) の調製

mRNA の調製は、mRNA ピュアリフィケーションキット (ファルマシアバイオテック社製) を用いて行った。

まず上記 (1) で調製した全 RNA のうち、1 mg を 1 ml のエリューションバッファーに溶解し、これに 65℃、10 分間の熱変性処理を加えた。氷中で急冷の後、0.2 ml のサンプルバッファーを加えた。この全量の RNA 溶液をオリゴ (dT) セルロースカラムにチャージし、ハイソルトバッファーで 3 回、ロウソルトバッファーで 3 回カラムを洗浄の後、65℃に加温したエリューションバッファーで溶出した。このカラム操作を 2 回繰り返し、mRNA 画分とした。収量は 19.2  $\mu$ g、収率は 2% であった。

#### (3) cDNA の合成

cDNA 合成は、タイムセーバー cDNA 合成キット (ファルマシアバイオテック社製) を用いて行った。

まず、5  $\mu$ g の mRNA を 20  $\mu$ l のサンプルバッファーに溶解した。65℃、

10分間の熱処理の後、ファーストストランド合成ミックスにジチオスレイトール溶液およびオリゴ (dT) プライマーと共に添加し、37℃で1時間反応させた。次に、この全量をセカンドストランドミックスに加え、12℃、30分間、次いで22℃、1時間反応させ、これをcDNAとした。

#### (4) セルラーゼNCE4 cDNAのPCR法による増幅

合成したcDNAのうち1μgを鋳型とし、目的のcDNAのみをPCR法により増幅した。N末端およびC末端のプライマーとして以下の様な配列のオリゴヌクレオチドプライマーを作製した。

NCE4-CN: 5'-ATGCGTTCCTCCCCTCTCCTCCGCTCCGCC-3' (30mer)

NCE4-CC: 5'-TACAGGCACTGATGGTACCAGTCATTAATC-3' (30mer)

PCR反応は、以下の条件で行った。まず、フミコーラ・インソレンスcDNA 1μgに対し、プライマーを各1μM加え、dNTP存在下、94℃、10分間熱変性を行った。その後、Taqポリメラーゼ (リコンビナントTaq、宝酒造社製) を加え、94℃1分間、50℃2分間、72℃3分間の反応条件を30回繰り返すことにより増幅した。増幅された断片は、アガロースゲル電気泳動の結果、0.9kbpの大きさであった。これをエタノール沈殿化により濃縮し、pT7ブルーT-ベクターキット (ノバジェン社製) によりクローン化した。このプラスミドをpCNCE4とした。

#### (5) cDNAの塩基配列解析

シーケンシング反応は前述同様オートリードシーケンシングキットを用いた。

プラスミドpCNCE4を2M水酸化ナトリウムでアルカリ変性し、エタノールで沈殿化した。この一本鎖プラスミドをテンプレートとし、T7ポリメラーゼで反応させた。前記合成プライマーMNEG01、MNEG02、MNEG03、MNEG04、MNEG05、MNEG06、MNEG07、およびMNEG08ならびにキット添付のユニバーサルプライマー、リバースプライマーを用いて反応を行い、配列を解読した。

その結果、56bpの一つのイントロンが存在した。配列番号3の配列において、非翻訳開始配列およびその終了配列、イントロン内部の調整配列は下記の通りである（数字は配列番号3の配列位置番号である）。

Introne : 453～458、506～508、491～497

#### 実施例B1：プラスミドpMKD01の作製

##### (1) プラスミドpUC118BNの作製

pUC118 DNA 1 $\mu$ gをBamH Iによって切断後、フェノール処理によって制限酵素を失活させた。これをエタノール沈殿し、少量のTE（10mMトリス塩酸（pH8.0）、1mM EDTA）緩衝液に溶解した。このDNAをDNA ブランディング キット（宝酒造社製）によって末端を平滑化した。これをさらにDNA ライゲイション キット（宝酒造社製）によって連結し、自己閉環させた。得られた連結混合物をE. coli competent cells JM109（宝酒造社製）に形質転換した。形質転換体について、100 $\mu$ g/mlのアンプシリン、1mM IPTG、0.004% X-galを含むLB寒天培地（1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、1.5%寒天）上で生育可能で、かつ白色のコロニーを呈するものを選抜し、これを更に、100 $\mu$ g/mlのアンプシリンを含むLB培地（1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl）において一晩、37℃で培養した。得られた培養液から、アルカリーSDS法を用いてプラスミドDNAを回収した。このプラスミドDNAをBamH Iによって切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、pUC118 DNAのBamH I部位を破壊したプラスミドDNAを選択した。このプラスミドDNAをpUC118BNとした。

##### (2) プラスミドpUC118BSNの作製

pUC118BN DNA 1 $\mu$ gをSph I によって切断し、前述と同様の方法により、pUC118BN のSph I 部位を破壊したプラスミドDNAを得た。

このプラスミドDNAをpUC118BSNとした。

(3) プラスミドpM21の作製

(A) セルラーゼNCE2遺伝子の単離

フミコーラ・インソレンスから、特開平8-126492号公報に記載の方法によって得られる、セルラーゼNCE2遺伝子、ならびにそのプロモーターおよびターミネーター領域として上流に1.4Kb、下流に0.5KbのDNA配列を有する全長3.4KbpのPst I ~Xba I 断片を、先のpUC118BSNのPst I ~Xba I 部位に連結した。得られたプラスミドDNAをpUC118BSN-PXとした。

(B) プラスミドpUC118BSN-PXの部位指定変異処理

NCE2遺伝子のN末端の下流および終止コドンのすぐ下流に、BamH I部位を以下のように部位指定変異により導入した。プラスミドpUC118BSN-PXによりE. coli JM109株を形質転換し、さらにヘルパーファージM13KO7を感染させた後、アンピシリン、カナマイシンをそれぞれ150  $\mu$ g/ml、70  $\mu$ g/mlの濃度で含む30mlの、2×YT液体培地（1.6%バクトトリプトン、0.8%酵母エキス、0.5%NaCl）において、37℃で、16~20時間培養した。培養上清よりM13の一本鎖DNA（ssDNA）を回収した。このssDNAと2種の合成オリゴヌクレオチドを用い、スカルプターインビトロミュータジェネシスシステム（アマシャム社製）を使用して、部位指定変異処理を行った。作製した合成オリゴヌクレオチドプライマーの配列は以下に示されるとおりであった。

MNC-02 5'-GAGCGCCAGAACTGTGGATCCACTTGGTGAGCAATG-3' (36mer)

MNC-03 5'-TCCGCCGTTCTGAGCGGATCCAGGCGTTTGGCGCG-3' (35mer)

部位指定変異処理したDNA混合液を、E. coli TG1に導入し、得られた形質転換体を100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB培地（1%ポリペプトン、



0. 5%酵母エキス、1%NaCl)にて培養し、プラスミドDNAを回収した。このプラスミドDNAをBamH Iによって切断し、0. 8%アガロースゲル電気泳動に供し、プラスミドpUC118BSN-PXに二箇所BamH I部位の導入されたプラスミドDNAを選択した。このプラスミドDNAをpM21とした。

#### (4) セルラーゼNCE3遺伝子の単離

公知の*Humicola grisea* 由来のセロビオハイドロラーゼ遺伝子 (de Oliviera Alzevedo, M. et al., J. General Microbiol., 136:2569-2576, 1990) の配列をもとに、フミコーラ・インソレンス由来のセロビオハイドロラーゼ遺伝子 (NCE3) をPCR法により単離した。

##### (A) ゲノムDNAの単離

前記実施例A3の方法によりフミコーラ・インソレンスMN200-1のゲノムDNAを得た。

##### (B) セルラーゼNCE3遺伝子のPCR法による増幅

*Humicola grisea* 由来のセロビオハイドロラーゼ遺伝子の配列をもとに、フミコーラ・インソレンスのNCE3遺伝子をPCR法により単離した。このNCE3を含むPCR産物が、プラスミドpM21のBamH I部位にフレームを合わせて連結できるように、各プライマーにはあらかじめBamH I部位を含む形で設計した。プライマーとして以下のような配列の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

MKA-05: 5'-GCCGCCCAGCAGGCGGGATCCCTCACCACCGAGAGG-3' (36mer)

MKA-06: 5'-TGATCGTCGAGTCAGGGATCCAGAATTTACAGGCAC-3' (36mer)

PCR反応はLA PCR Kit Ver. 2 (宝酒造社製) に従い、以下の方法で行った。まず、前述の方法によって得られるフミコーラ・インソレンスゲノムDNA 1  $\mu$ g に対し、プライマーを各1  $\mu$ M、400  $\mu$ M dNTP、LA Taqポリメラーゼ2.5 Uを加え、94℃1分間、55℃2分間、72℃3分間の反応条件を30回繰り返すことにより増幅した。0. 8%アガロースゲル電気泳動の結果、1. 6 K

b p の DNA の増幅が確認された。この 1. 6 K b p の DNA 断片をセファグロスバンドプレップ キット (ファルマシアバイオテク社製) を用いて回収し、これを pT7 ブルーT-ベクター キット (ノバジェン社製) に連結した。このプラスミド DNA を p K 2 1 とした。

#### (5) プラスミド p K M 0 4 の作製

プラスミド p K 2 1 DNA を BamH I によって消化し、1. 6 K b p の DNA 断片を回収した。次に、プラスミド p M 2 1 DNA を BamH I によって消化し、さらに 70℃ で 10 分間処理し、制限酵素を失活させた。これを子牛由来のアルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) によって脱リン酸化し、さらに、これを 0. 8 % アガロースゲル電気泳動により分離し、5. 2 K b p の DNA 断片を回収した。p K 2 1 由来の 1. 6 K b p の DNA 断片と p M 2 1 由来の 5. 2 K b p の DNA 断片を連結し、プラスミド p K M 0 4 を得た。

#### (6) プラスミド p M K D 0 1 の作製

まず、公知の方法により得られる *Aspergillus nidulans* 由来 trp C 遺伝子のプロモーターおよびターミネーター (Mullaney, E. J. et al., Mol. Gen. Genet. 199:37-45, 1985) を用いて、特開昭 59-175889 号公報に記載されているデストマイシン耐性遺伝子をフミコーラ・インソレンスで発現可能にした遺伝子を作製した。これを、プラスミド p K M 0 4 の Xba I 部位に導入し、プラスミド p M K D 0 1 を作製した。

### 実施例 B 2 : プラスミド p M K D 0 1 によるフミコーラ・インソレンスの形質転換

#### (1) プラスミド p M K D 0 1 の高濃度精製標品の調製

プラスミド p M K D 0 1 をフミコーラ・インソレンスに導入するために、まず p M K D 0 1 の高濃度精製標品を調製した。p M K D 0 1 を *E. coli* J M 1 0 9

に導入し、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む $100\text{ml}$  LB培地において一晩、 $37^\circ\text{C}$ で培養した。得られた培養液をフレキシプレップ キット（ファルマシアバイオテック社製）を用いて精製し、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のpMKD01プラスミドDNAを得た。

## (2) フミコーラ・インソレンスの形質転換

フミコーラ・インソレンスMN200-1を(S)培地中 $37^\circ\text{C}$ で培養し、24時間後、 $3000\text{rpm}$ 、10分間遠心分離により集菌した。ここで、(S)培地の組成は、前述(N)培地にグルコース(3.0%)を加え、かつアビセルを除いたものである。得られた菌体を $0.5\text{M}$ シュクロースで洗浄し、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターで濾過したプロトプラスト化酵素溶液( $5\text{mg}/\text{ml}$  Novozyme 234 (NLI社製)、 $5\text{mg}/\text{ml}$  Cellulase Onozuka R-10 (ヤクルト社製)、 $0.5\text{M}$  シュクロース)  $10\text{ml}$ に懸濁した。 $30^\circ\text{C}$ で60～90分間振盪し、菌糸をプロトプラスト化させた。この懸濁液を濾過した後、 $2500\text{rpm}$ 、10分間遠心分離してプロトプラストを回収し、SUTC緩衝液( $0.5\text{M}$ シュクロース、 $10\text{mM}$ 塩化カルシウム、 $10\text{mM}$ トリス塩酸(pH7.5))で洗浄した。

以上のように調製したプロトプラストを $1\text{ml}$ のSUTC緩衝液に懸濁し、この $100\mu\text{l}$ に対し $10\mu\text{g}$ のDNA(TE)溶液( $10\mu\text{l}$ )を加え、氷中に5分間静置した。つぎに、 $400\mu\text{l}$ のPEG溶液(60% PEG4000、 $10\text{mM}$ 塩化カルシウム、 $10\text{mM}$ トリス塩酸(pH7.5))を加え、氷中に20分間静置した後、 $10\text{ml}$ のSUTC緩衝液を加え、 $2500\text{rpm}$ 、10分間遠心分離した。集めたプロトプラストを $1\text{ml}$ のSUTC緩衝液に懸濁した後、 $4000\text{rpm}$ で5分間遠心分離して、最終的に $100\mu\text{l}$ のSUTC緩衝液に懸濁した。

以上の処理を加えたプロトプラストを、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ のハイグロマイシン

Bを含むYMG培地（1%グルコース、0.4%酵母エキス、0.2%モルトエキス、1%寒天（pH6.8））上に、YMG軟寒天とともに重層し、37℃で5日間培養した後、形成したコロニーを形質転換体とした。

（3）pMKD01による形質転換株の培養およびSDS-PAGEによる評価

前記のようにプラスミドpMKD01をフミコーラ・インソレンスMN200-1に導入し、ハイグロマイシン耐性を示す株を50株選抜した。これらを（N）培地で37℃で5日間培養した。得られた培養上澄をSDS-PAGEにより解析したところ、pMKD01による形質転換株のうち5クローンにおいて、NCE3と推定されるタンパク質バンドが、親株より3～4倍増加していた。

（4）組み換えNCE3のN末端アミノ酸残基の同定

SDS-PAGEの結果から、大量発現したタンパク質バンドがNCE3遺伝子由来であることを確認するために、このタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した。まず、親株とNCE3高発現株から得られた培養上澄について、前記実施例A2の方法に従いFPLCシステムを用いたカラムクロマトグラフィーを行い、主要なピークを比較した。NCE3高発現株において特に増加しているピークを分取し、凍結乾燥した。これを少量の水に溶解し、8%Gel SDS-PAGE mini（テフコ社製）を用いて電気泳動した。これを前記実施例A2の方法に従ってPVDF膜に、タンパク質を電氣的にうつしとり、コマジープリリアントブルーR-250で染色した後、脱色し、水で洗浄した。ここから、分子量66KDのタンパク質がプロットされた部分を切り出し、プロットされたタンパク質を、Podell, D. N.らの方法（Podell, D. N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 81:176, 1978）に従い、修飾N末端残基を除去した。まず、目的タンパク質を切り出し、少量の0.5%ポリビニルピロリドン（分子量40,000、シグマ社製）／100mM酢酸溶液中で、37℃で30分間保温した後、水でよく洗浄した。次に、

Pfu ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ（宝酒造社製）により修飾N末端残基を除去し、水で洗浄、風乾した。これをプロテインシーケンサーModel 492 に供し、N末端側アミノ酸配列を15残基決定した。得られた配列は以下に示される通りであった。

N末端アミノ酸配列：Asn-Cys-Gly-Ser-Leu-Thr-Thr-Glu-Arg-His-Pro-Ser-Leu-Ser-Trp （15残基）

このN末端側アミノ酸配列は、プラスミドpMKD01の塩基配列から推定されるセルラーゼNCE2、NCE3融合タンパク質のアミノ酸配列と一致した。

#### （5）pMKD01による形質転換株のFPLCによる評価

前述の様にSDS-PAGEでNCE3の大量発現が確認された5クローンの培養上澄をさらに定量するために、FPLCシステムによりカラムクロマトグラフィーを行った。その条件は前記（4）と同一とした。NCE3のピークを分取し、これを凍結乾燥し、重量を測定して高発現株と親株の生産性を比較した。その結果は、次の表に示されるとおりであった。

第1表

	NCE3生産量*
フミコーラ・インソレンスMN200-1（親株）	0.46 g
フミコーラ・インソレンスpMKD01	1.8 g

\*：生産量は培養液1Lあたりの生産量である。

#### 実施例B3：プラスミドpEGD01の作製

プラスミドpMKD01をBamH Iによって消化し、さらに70℃の熱処理によって制限酵素を失活させ、脱リン酸化処理し、8.2KbpのDNA断片を回収した。

次に、上記実施例A1～7で得られたフミコーラ・インソレンス由来のNCE

4遺伝子の配列をもとに、PCR法によりNCE 4遺伝子を増幅した。このNCE 4を含むPCR産物は、前述プラスミドpMKD01の8.2KbpのBamH I断片にフレームを合わせて連結できるように、各プライマーにはあらかじめBamH I部位を含む形で設計した。プライマーとして以下の配列の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

NCE4-N: 5'-CCGGTGTGGCCGGATCCGCTGATGGCAAG-3' (30mer)

NCE4-C: 5'-TAAGGCCCTCAAGGATCCCTGCGTCTACAG-3' (30mer)

PCR反応は、以下のように行った。フミコーラ・インソレンスゲノムDNA 1  $\mu$ g に対し、プライマーを各1  $\mu$ M、400  $\mu$ M dNTP、Pfu DNA ポリメラーゼ（ストラタジーン社製）2.5 Uを加え、94°C 1分間、55°C 2分間、72°C 3分間の反応条件を25回繰り返すことにより0.8KbpのDNA断片を増幅した。この0.8KbpのDNA断片を回収し、これを前述pMKD01の8.2Kbp BamH I断片に連結した。このプラスミドDNAをpEGD01とした。

#### 実施例B4：プラスミドpEGD01の発現

(1) プラスミドpEGD01によるフミコーラ・インソレンスの形質転換

プラスミドpEGD01によるフミコーラ・インソレンスMN200-1の形質転換は、実施例B2の方法に従って行った。まず、pEGD01の高濃度精製標品を調製し、1  $\mu$ g/ $\mu$ lのpEGD01プラスミドDNAを得た。このpEGD01溶液を10  $\mu$ l使用して、フミコーラ・インソレンスMN200-1を形質転換し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株を50株選抜した。これらを(N)培地で37°Cで5日間培養した。得られた培養上澄をSDS-PAGEにより解析したところ、pEGD01による形質転換株のうち10クローンにおいて、NCE 4と推定されるタンパク質バンドが、親株より10～16倍増加していた。

## (2) 組み換えNCE 4のN末端アミノ酸残基の同定

SDS-PAGEの結果から、大量発現したタンパク質バンドがNCE 4遺伝子由来であることを確認するために、このタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した。まず、親株、NCE 4高発現株から得られた培養上澄をFPLCシステムでカラムクロマトグラフィーを行い、主要なピークを比較した。条件は上記実施例B2と同一とした。NCE 4高発現株において特に増加しているピークを分取し、凍結乾燥した。これを少量の水に溶解した。実施例B2の方法に従って修飾N末端残基を除去した後、前述のプロテインシーケンサーによって、N末端側アミノ酸配列を決定した。その結果、2種類のN末端側アミノ酸配列がおおよそ7:3の割合で得られた。得られた配列は以下に示される通りであった。次に、修飾N末端を除去せずに前述のプロテインシーケンサーによって、N末端側アミノ酸配列を決定した。その結果、以下に示されるアミノ酸配列1のみが得られた。

N末端アミノ酸配列1: Val-Val-Glu-Glu-Arg-Gln-Asn-Cys-Gly-Ser-Ala-Asp-Gly-Lys-Ser-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp (20残基)

N末端アミノ酸配列2: Asn-(Cys)-Gly-Ser-Ala-Asp-Gly-Lys-Ser-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp-(Cys)-(Cys)-Lys-Pro-Ser-(Cys) (20残基)

これらのN末端側アミノ酸配列は、プラスミドpEGD01の塩基配列から推定されるセルラーゼNCE 2およびNCE 4融合タンパク質のアミノ酸配列と一致した。N末端側アミノ酸配列が2種類得られたことで、本融合タンパク質のシグナル配列が切断される際、複数の位置でプロセスされることが明らかとなった。

## (3) pEGD01による形質転換株のFPLCによる評価

前述の様にSDS-PAGEでNCE 4の大量発現が確認された5クローンの培養上澄をさらに定量するために、FPLCシステムでカラムクロマトグラフィーを行い、NCE 4のピークを分取した。これを凍結乾燥し、重量を測定し、高発現株と親株の生産性を比較した。その結果は、次の表に示される通りであった。

第2表

	NCE4生産量*
フミコーラ・インソレンスMN200-1 (親株)	0.28 g
フミコーラ・インソレンスpMKEG1	4.5 g

\* : 生産量は培養液1 Lあたりの生産量である。

### 実施例B5 : プラスミドpIED02の作製

#### (1) プラスミドpIED01の作製

プラスミドpEGD01をHind IIIおよびBamH Iによって消化し、7.2 KbpのDNA断片を回収した。

次に、特開平8-5663号公報に記載の方法で得られるフミコーラ・インソレンス由来のNCE1遺伝子の配列をもとに、PCR法によりNCE1遺伝子のプロモーターおよびシグナル配列をコードする部分のDNAを増幅した。このNCE1プロモーターおよびシグナル配列を含むPCR産物は、前述プラスミドpEGD01の7.2 KbpのHind III～BamH I断片に連結できるように、各プライマーにはあらかじめHind III、BamH I部位を含む形で設計した。プライマーとして以下の配列の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

PNCE1-N: 5'-GTCATGAAGCTTCATTAAGGTACGTATGCAAC-3' (32mer)

PNCE1-C: 5'-GGTGATGGATCCGGCCTGCTGGGCAGCGACGC-3' (32mer)

PCR反応は、実施例3と同様に行った。フミコーラ・インソレンスゲノムDNA 1  $\mu$ g 対し、プライマー各1  $\mu$ M、400  $\mu$ M dNTP、Pfu DNA ポリメラーゼ2.5 Uを加え、94℃1分間、55℃2分間、72℃4分間の反応条件を23回繰り返すことにより1.5 KbpのDNA断片を増幅した。このPCR産物をHind IIIおよびBamH Iによって消化し、1.5 KbpのDNA断片を回収した。これを前述pEGD01の7.2 KbpのHind III～BamH I断片に連結した。こ



のプラスミドDNAをpIED01とした。

## (2) プラスミドpIED02の作製

プラスミドpIED01をBamH Iによって消化し、70℃の熱処理で制限酵素を失活させ、さらに脱リン酸化処理した後、8.6KbpのDNA断片を回収した。次に、プラスミドpEGD01をBamH Iによって消化した後、NCE4遺伝子を含む0.8KbpのDNA断片を回収した。2つの断片を連結し、プラスミドpIED02を得た。

## 実施例B6：プラスミドpIED02の発現

### (1) プラスミドpIED02によるフミコーラ・インソレンスの形質転換

プラスミドpIED02によるフミコーラ・インソレンスのMN200-1形質転換は、実施例B2の方法に従って行った。まず、pIED02の高濃度精製標品を調製し、1 $\mu$ g/ $\mu$ lのpIED02プラスミドDNAを得た。このpIED02溶液を10 $\mu$ l使用して、フミコーラ・インソレンスMN200-1を形質転換し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株を50株選抜した。これらを(N)培地で37℃で5日間培養した。得られた培養上澄をSDS-PAGEにより解析したところ、pIED02による形質転換株のうち5クローンにおいて、NCE4と推定されるタンパク質バンドが、親株より5~10倍増加していた。

### (2) 組み換えNCE4のN末端アミノ酸残基の同定

SDS-PAGEの結果から、大量発現したタンパク質バンドがNCE4遺伝子由来であることを確認するために、このタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した。まず、実施例B2と同様の方法によって、親株およびNCE4高発現株から得られた培養上澄についてFPLCシステムを用いたカラムクロマトグラフィーを行い、NCE4のピークを分取し、凍結乾燥した。これを少量の水に溶解

した。実施例B2の方法に従って修飾N末端残基を除去した後、前述のプロテインシーケンサーによって、N末端側アミノ酸配列を15残基決定した。得られた配列は以下に示される通りであった。

N末端アミノ酸配列： Gln-Ala-Gly-Ser-Ala-Asp-Gly-Lys-Ser-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp-(Cys) (15残基)

このN末端側アミノ酸配列は、プラスミドpIED02の塩基配列から推定されるセルラーゼNCE1、NCE4融合タンパク質のアミノ酸配列と一致した。

### (3) pEGD02による形質転換株のFPLCによる評価

前述の様にSDS-PAGEでNCE4の大量発現が確認された5クローンの培養上澄をさらに定量するために、FPLCシステムでカラムクロマトグラフィーを行い、NCE4のピークを分取した。これを凍結乾燥し、重量を測定し、高発現株と親株の生産性を比較した。その結果は、次の表に示されるとおりであった。

第3表

	NCE4生産量*
フミコーラ・インソレンスMN200-1 (親株)	0.28 g
フミコーラ・インソレンスpIED02	2.9 g

\*：生産量は培養液1Lあたりの生産量である。

配 列 表

配列番号 : 1

配列の長さ : 2 2 8 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : G e n o m i c   D N A

起源

生物名 : *Humicola insolens*

配列の特徴

特徴を表す記号 : s i g   p e p t i d e

存在位置 : 3 1 0 . . 3 7 5

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : m a t   p e p t i d e

存在位置 : 3 7 6 . . 1 8 9 0

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : i n t r o n

存在位置 : 8 8 0 . . 9 3 6

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : i n t r o n

存在位置 : 1 2 9 0 . . 1 3 4 8

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : i n t r o n

存在位置 : 1 7 8 0 . . 1 8 6 3

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : c l e a v a g e - s i t e

存在位置 : 240. . 245

他の情報 : S a l I

特徴を表す記号 : c l e a v a g e - s i t e

存在位置 : 603. . 608

他の情報 : S a l I

特徴を表す記号 : c l e a v a g e - s i t e

存在位置 : 760. . 765

他の情報 : S a l I

特徴を表す記号 : c l e a v a g e - s i t e

存在位置 : 1152. . 1157

他の情報 : K p n I

特徴を表す記号 : c l e a v a g e - s i t e

存在位置 : 1267. . 1272

他の情報 : S a l I

#### 配列

TCTCCAATAA CGACGAAGCG ACTGTTGGCT GATCAATTAG CTGGCGATGG GTCTGTGGTA	60
TGGAACGTCG GCTGAGTCTT CCATCTCCCA CCGTAGACGT GTTCCGCGGA TCAAGGTCTC	120
CCGCTCCGTA ACCGCCAGG TGGCTCGGTT CTTGATGATG GGAAAGGGGC CGACGGCAGT	180
ATAAAGAGCC ATGGAAGCAT CCCTCGAGGC CGGAAGGAAA TCTTGCTCAG CCACCCGCAG	240
TCGACTTGTC TATCGATCTG AGCAGCAGTT GACCGGTCTT CTCTGTCATC TCAGCAGCAG	300
TCTTTCAAG ATG CAG ATC AAG AGC TAC ATC CAG TAC CTG GCC GCG	345

Met Gln Ile Lys Ser Tyr Ile Gln Tyr Leu Ala Ala

GCT CTG CCG CTC CTG AGC AGC GTC GCT GCC CAG CAG GCC GGC ACC ATC 393

Ala Leu Pro Leu Leu Ser Ser Val Ala Ala Gln Gln Ala Gly Thr Ile

-10                      -5                      1                      5

ACC GCC GAG AAC CAC CCC AGG ATG ACC TGG AAG AGG TGC TCG GGC CCC 441

Thr Ala Glu Asn His Pro Arg Met Thr Trp Lys Arg Cys Ser Gly Pro

10                      15                      20

GGC AAC TGC CAG ACC GTG CAG GGC GAG GTC GTC ATC GAC GCC AAC TGG 489

Gly Asn Cys Gln Thr Val Gln Gly Glu Val Val Ile Asp Ala Asn Trp

25                      30                      35

CGC TGG CTG CAC AAC AAC GGC CAG AAC TGC TAT GAG GGC AAC AAG TGG 537

Arg Trp Leu His Asn Asn Gly Gln Asn Cys Tyr Glu Gly Asn Lys Trp

40                      45                      50

ACC AGC CAG TGC AGC TCG GCC ACC GAC TGC GCG CAG AGG TGC GCC CTC 585

Thr Ser Gln Cys Ser Ser Ala Thr Asp Cys Ala Gln Arg Cys Ala Leu

55                      60                      65                      70

GAC GGT GCC AAC TAC CAG TCG ACC TAC GGC GCC TCG ACC AGC GGC GAC 633

Asp Gly Ala Asn Tyr Gln Ser Thr Tyr Gly Ala Ser Thr Ser Gly Asp

75                      80                      85

TCC CTG ACG CTC AAG TTC GTC ACC AAG CAC GAG TAC GGC ACC AAC ATC 681

Ser Leu Thr Leu Lys Phe Val Thr Lys His Glu Tyr Gly Thr Asn Ile

90 95 100

GGC TCG CGC TTC TAC CTC ATG GCC AAC CAG AAC AAG TAC CAG ATG TTC 729

Gly Ser Arg Phe Tyr Leu Met Ala Asn Gln Asn Lys Tyr Gln Met Phe

105                      110                      115

ACC CTG ATG AAC AAC GAG TTC GCC TTC GAT GTC GAC CTC TCC AAG GTT	777
Thr Leu Met Asn Asn Glu Phe Ala Phe Asp Val Asp Leu Ser Lys Val	
120 125 130	
GAG TGC GGT ATC AAC AGC GCT CTG TAC TTC GTC GCC ATG GAG GAG GAT	825
Glu Cys Gly Ile Asn Ser Ala Leu Tyr Phe Val Ala Met Glu Glu Asp	
135 140 145 150	
GGT GGC ATG GCC AGC TAC CCG AGC AAC CGT GCT GGT GCC AAG TAC GGC	873
Gly Gly Met Ala Ser Tyr Pro Ser Asn Arg Ala Gly Ala Lys Tyr Gly	
155 160 165	
ACG GGC GTACGTTCTC TCCGTCCCGC CCCTACCAAA AGTATGACTC GTGCTGACGT	929
Thr Gly	
TTG ACAG TAC TGC GAT GCC CAA TGC GCC CGT GAC CTC AAG TTC ATT GGC	978
Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Ala Arg Asp Leu Lys Phe Ile Gly	
170 175 180	
GGC AAG GCC AAC ATT GAG GGC TGG CGC CCG TCC ACC AAC GAC CCC AAC	1026
Gly Lys Ala Asn Ile Glu Gly Trp Arg Pro Ser Thr Asn Asp Pro Asn	
185 190 195	
GCC GGT GTC GGT CCC ATG GGT GCC TGC TGC GCT GAG ATC GAC GTT TGG	1074
Ala Gly Val Gly Pro Met Gly Ala Cys Cys Ala Glu Ile Asp Val Trp	
200 205 210	
GAG TCC AAC GCC TAT GCT TAT GCC TTC ACC CCC CAC GCC TGC GGC AGC	1122
Glu Ser Asn Ala Tyr Ala Tyr Ala Phe Thr Pro His Ala Cys Gly Ser	
215 220 225 230	

AAG AAC CGC TAC CAC ATC TGC GAG ACC AAC AAC TGC GGT GGT ACC TAC 1170

Lys Asn Arg Tyr His Ile Cys Glu Thr Asn Asn Cys Gly Gly Thr Tyr

235

240

245

TCG GAT GAC CGC TTC GCC GGC TAC TGC GAC GCC AAC GGC TGC GAC TAC 1218

Ser Asp Asp Arg Phe Ala Gly Tyr Cys Asp Ala Asn Gly Cys Asp Tyr

250

255

260

AAC CCC TAC CGC ATG GGC AAC AAG GAC TTC TAT GGC AAG GGC AAG ACC 1266

Asn Pro Tyr Arg Met Gly Asn Lys Asp Phe Tyr Gly Lys Gly Lys Thr

265

270

275

GTC GAC ACC AAC CGC AAG TTC AC GTAAGTTCCC TGGCCGCCTC TTCGACGACG CAG 1322

Val Asp Thr Asn Arg Lys Phe Th

280

285

AATGTCCGGA TGCTGACCCA GAACAG C GTT GTC TCC CGC TTC GAG CGT AAC AGG 1376

r Val Val Ser Arg Phe Glu Arg Asn Arg

290

295

CTC TCT CAG TTC TTC GTC CAG GAC GGC CGC AAG ATC GAG GTG CCC CCT 1424

Leu Ser Gln Phe Phe Val Gln Asp Gly Arg Lys Ile Glu Val Pro Pro

300

305

310

CCG ACC TGG CCC GGC CTC CCG AAC AGC GCC GAC ATC ACC CCT GAG CTC 1472

Pro Thr Trp Pro Gly Leu Pro Asn Ser Ala Asp Ile Thr Pro Glu Leu

315

320

325

TGC GAT GCT CAG TTC CGC GTC TTC GAT GAC CGC AAC CGC TTC GCC GAG 1520

Cys Asp Ala Gln Phe Arg Val Phe Asp Asp Arg Asn Arg Phe Ala Glu

330

335

340

ACC GGT GGC TTC GAT GCT CTG AAC GAG GCC CTC ACC ATT CCC ATG GTC 1568  
 Thr Gly Gly Phe Asp Ala Leu Asn Glu Ala Leu Thr Ile Pro Met Val  
 345 350 355  
 CTT GTC ATG TCC ATC TGG GAT GAC GTATGTGGCA CCAACCTCCA ACCGGGCATG AG 1624  
 Leu Val Met Ser Ile Trp Asp Asp  
 360 365  
 ACCTGTACTG ACGTGTCTTG ACAG CAC CAC TCC AAC ATG CTC TGG CTC GAC TCC 1678  
 His His Ser Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser  
 370 375  
 AGC TAC CCG CCC GAG AAG GCC GGC CTC CCC GGT GGC GAC CGT GGC CCG 1726  
 Ser Tyr Pro Pro Glu Lys Ala Gly Leu Pro Gly Gly Asp Arg Gly Pro  
 380 385 390  
 TGC CCG ACC ACC TCT GGT GTC CCT GCC GAG GTC GAG GCT CAG TAC CCC 1774  
 Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Glu Val Glu Ala Gln Tyr Pro  
 395 400 405  
 AAT GC GTACGTTACT ACCGCCGCTG CATCTGCAAA AAATACCGGT GCTAACCATT GTG 1832  
 Asn Al  
 410  
 CAG T CAG GTC GTC TGG TCC AAC ATC CGC TTC GGC CCC ATC GGC TCG ACC 1881  
 a Gln Val Val Trp Ser Asn Ile Arg Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr  
 415 420 425  
 GTC AAC GTC TAAGCTATCA CGGCTCAAAA TCAGCGCCCG CTCTGCTCGT CCTGTTCGGC 1940  
 Val Asn Val  
 GCGCCAGTAG GGGGATATGG GGCATTCTT TGTTCAGCA TTTTCTCTT CGTCCTGCTA 2000  
 CATATTGAGA TTGTGTATCG TATGCACGG TACAAAGTAG AAACCATGAT CAAGTCTCAT 2060



TGAACTATAC TGCTGCTCCC AAGATTAATT ATGCCGTAAT GGTCTGTTTG CTTTTTTTTT 2120  
TTTTTTTTTT TGGTGCACTT GATCGTGTGG CACATTGGCC GCTGTATGTA TGGCTTCCCT 2180  
CAATCGCCGA CTGACTCAAA ACGGCAGTAC AACAGAAGCC CCATTGCATC AGAAGAGAGG 2240  
TTTTATAATG CCATGAGGTG TTCTCAGATG AAAGACTTCG AGTAT 2285

配列番号：2

配列の長さ：2409

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：Humicola insolens

配列の特徴

特徴を表す記号：sig peptide

存在位置：389..457

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：458..2098

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：intron

存在位置：478..535

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：intron

存在位置：1030..1141

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号 : i n t r o n

存在位置 : 1 7 6 2 . . 1 8 1 5

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : i n t r o n

存在位置 : 1 9 9 0 . . 2 0 4 4

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : c l e a v e g e - s i t e

存在位置 : 6 8 8 . . 6 9 3

他の情報 : S m a I

特徴を表す記号 : c l e a v e g e - s i t e

存在位置 : 1 2 5 3 . . 1 2 5 9

他の情報 : B a m H I

特徴を表す記号 : c l e a v e g e - s i t e

存在位置 : 1 5 0 5 . . 1 5 1 0

他の情報 : B g l I I

特徴を表す記号 : c l e a v e g e - s i t e

存在位置 : 1 6 4 3 . . 1 6 4 8

他の情報 : S t u I

#### 配列

TGCTGGACCT TGGATGCGTC TGCCGAGCTG TCGTGCGGA AGAGTCGAGC GTGATTCCGG	60
CATCACTGAA CACTCGCTGG TTGCTGGTTC TGGAAGCGGT ACGTCCGGCG CAAACCAGCA	120
AAAGCAGGTT TCGCTGCCT TGGCCTCCGT GAGAGGCATG ATGCCAAGGA TGAATGGTTC	180
CTCTGCGGAC TCAACCATCC GCACTTCGAG CCCGACGATC CGGGCCCCCT GCTCCGGCGC	240
GGAGAGCCGT GGTGAGCTCC AAGTGATGCG GAATCGGTGA TGTGCAAGAT GCGGAGGGCA	300
TAAAAAGGCT GTTCCCACA CGAAGCATTC TCCAGCTTGT TTCCTCACGG CACACGGTCA	360

4 1

AACAAGTCTG TGCAGTACCT GGGACAAG ATG GCC AAG TTC TTC CTT ACT GCT 412

Met Ala Lys Phe Phe Leu Thr Ala

-20

GCC TTT GCG GCT GCC GCT CTC GCC GCT CCC GTT GTT GAG GAG CGC CAG 460

Ala Phe Ala Ala Ala Ala Leu Ala Ala Pro Val Val Glu Glu Arg Gln

-15

-10

-5

1

AAC TGT GCC CCG ACT TG GTGAGCAATG GTGTTTCATG GATCGTGTCT TTGGATGTGC 517

Asn Cys Ala Pro Thr Tr

5

GGCTAACAAC CATTCCAG G GGC CAG TGC GGT GGC ATC GGC TTC AAT GGC 566

p Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe Asn Gly

10

15

CCG ACT TGC TGC CAG TCT GGT AGC ACC TGC GTG AAG CAG AAC GAC TGG 614

Pro Thr Cys Cys Gln Ser Gly Ser Thr Cys Val Lys Gln Asn Asp Trp

20

25

30

TAC TCC CAG TGC TTG CCC GGT AGC CAG GTC ACC ACG ACC TCG ACT ACG 662

Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Gly Ser Gln Val Thr Thr Thr Ser Thr Thr

35

40

45

TCG ACT TCG AGC TCG TCG ACC ACC TCC CGG GCC ACC TCG ACC ACC AGG 710

Ser Thr Ser Ser Ser Ser Thr Thr Ser Arg Ala Thr Ser Thr Thr Arg

50

55

60

65

ACC GGT GGT GTG ACC TCG ATC ACC ACT GCT CCC ACC CGC ACC GTC ACC 758

Thr Gly Gly Val Thr Ser Ile Thr Thr Ala Pro Thr Arg Thr Val Thr

70

75

80

ATC CCT GGC GGT GCC ACC ACC ACG GCC AGC TAC AAC GGC AAC CCC TTC	806
Ile Pro Gly Gly Ala Thr Thr Thr Ala Ser Tyr Asn Gly Asn Pro Phe	
85 90 95	
GAG GGT GTC CAG CTC TGG GCC AAC AAC TAC TAC CGC TCT GAG GTC CAC	854
Glu Gly Val Gln Leu Trp Ala Asn Asn Tyr Tyr Arg Ser Glu Val His	
100 105 110	
ACC CTC GCC ATT CCT CAG ATC ACC GAC CCT GCC TTG AGG GCT GCG GCC	902
Thr Leu Ala Ile Pro Gln Ile Thr Asp Pro Ala Leu Arg Ala Ala Ala	
115 120 125	
TCG GCC GTC GCT GAG GTC CCG AGC TTC CAG TGG CTC GAC CGC AAC GTC	950
Ser Ala Val Ala Glu Val Pro Ser Phe Gln Trp Leu Asp Arg Asn Val	
130 135 140 145	
ACG GTC GAC ACC CTG CTC GTC GAG ACC CTC TCT GAG ATC CGC GCC GCG	998
Thr Val Asp Thr Leu Leu Val Glu Thr Leu Ser Glu Ile Arg Ala Ala	
150 155 160	
AAC CAG GCG GGC GCG AAC CCC CCG TAT GCC G GTAAGTGCGG TGTCACCACC	1049
Asn Gln Ala Gly Ala Asn Pro Pro Tyr Ala A	
165 170	
ACCAACCCTA ACCCTGACCC CTGACCACCA CATCATCAAC ATCACCACAC ATCTCCCACA	1109
TCATTCTGGA CGCAAATTAA CGCCAAATCC AG CC CAG ATC GTC GTT TAC GAC	1161
1a Gln Ile Val Val Tyr Asp	
175	
CTT CCT GAC CGC GAC TGC GCT GCC GCG GCT TCG AAC GGC GAG TGG GCG	1209
Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ala Ala Ala Ala Ser Asn Gly Glu Trp Ala	
180 185 190	

310 315 320

CCG CCG TAC ACC AGC CCC AAC CCC AAC TAC GAC GAG AAG CAC TAC ATC	1641
Pro Pro Tyr Thr Ser Pro Asn Pro Asn Tyr Asp Glu Lys His Tyr Ile	
325 330 335	
GAG GCC TTC CGC CCT CTC CTC GAG GCC CGC GGC TTC CCC GCC CAG TTC	1689
Glu Ala Phe Arg Pro Leu Leu Glu Ala Arg Gly Phe Pro Ala Gln Phe	
340 345 350	
ATC GTC GAC CAG GGC CGC AGC GGC AAG CAG CCC ACC GGC CAG AAG GAA	1737
Ile Val Asp Gln Gly Arg Ser Gly Lys Gln Pro Thr Gly Gln Lys Glu	
355 360 365 370	
TGG GGC CAC TGG TGC AAT GCC ATT GTACGTTAAG GTTAGGGTTA CATATTTGCG	1791
Trp Gly His Trp Cys Asn Ala Ile	
375	
TTCCCATGAC TAACATCCTT CCAG GGC ACC GGC TTC GGT ATG CGC CCG ACT	1842
Gly Thr Gly Phe Gly Met Arg Pro Thr	
380 385	
GCC AAC ACC GGC CAC CAG TAC GTC GAC GCC TTC GTC TGG GTC AAG CCC	1890
Ala Asn Thr Gly His Gln Tyr Val Asp Ala Phe Val Trp Val Lys Pro	
390 395 400	
GGC GGT GAG TGC GAC GGC ACC AGC GAC ACG ACC GCT GCC CGC TAC GAC	1938
Gly Gly Glu Cys Asp Gly Thr Ser Asp Thr Thr Ala Ala Arg Tyr Asp	
405 410 415	
TAC CAC TGC GGT CTC GAG GAC GCC CTC AAG CCC GCC CCT GAG GCC GGC	1986
Tyr His Cys Gly Leu Glu Asp Ala Leu Lys Pro Ala Pro Glu Ala Gly	
420 425 430 435	

CAG GTGAGCACCA AACCCGACCA CAACAAGAAA TGTACCAAAG GCTAACCAAC TCCAG 2044

Gln

TGG TTC CAA GCC TAC TTT GAG CAA TTA CTT CGT AAT GCC AAT CCG CCG 2092

Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu Arg Asn Ala Asn Pro Pro

440

445

450

TTC TGA GCGGTTTGAG GCGTTTGGCG CGATGTTGGC GATGTTTAGG ATCAAAAAGG 2148

Phe \*\*\*

GGGGGAAAAG GCGAAAAGGG GCCGGTCCGG GAGGCCCCAC AATATCGGCC CCACCCTCCG 2208

ATCACGTGCT CCCCGCATCG GCACAGACGT CGCTTAATGC ATTGAGGGGG TTGACAAAAT 2268

TCAAGTCTTC TTCTGTAAAT AGTTGGCATC TGCCATTGTT GGACAAGATT TAGTCTTTTCG 2328

AGTATATACA CTTTGTCCA ACGGGGTCTA GTAACTTCCG AGGTCATCTC ATCAAGCATT 2388

GTTTGAGTCT CGCGTTTATA C 2409

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 2 5 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : *Humicola insolens*

配列の特徴

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 4 5 3 . . 5 0 9

特徴を決定した方法 : E

配列

AATGACGGGG CAACCTCCCG CCCGGGCCCA ACTCTTGGGT TTGGTTTGAC AGGCCGTCTG	60
TCTCTTGCGT CCTCTTACTA CGCCTGCCTG GACCCTACGT CTCAACTCCG ATTCAAG	117
ATG CGT TCC TCC CCT CTC CTC CGC TCC GCC GTT GTG GCC GCC CTG CCG	165
Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro	
-20 -15 -10	
GTG TTG GCC CTT GCC GCT GAT GGC AAG TCC ACC CGC TAC TGG GAC TGC	213
Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys	
-5 1 5 10	
TGC AAG CCT TCG TGC GGC TGG GCC AAG AAG GCT CCC GTG AAC CAG CCT	261
Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro	
15 20 25	
GTC TTC TCC TGC AAC GCC AAC TTC CAG CGT CTC ACT GAC TTC GAC GCC	309
Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Leu Thr Asp Phe Asp Ala	
30 35 40	
AAG TCC GGC TGC GAG CCG GGC GGT GTC GCC TAC TCG TGC GCC GAC CAG	357
Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln	
45 50 55	
ACC CCA TGG GCT GTG AAC GAC GAC TTC GCG TTC GGT TTT GCT GCC ACC	405
Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Phe Gly Phe Ala Ala Thr	
60 65 70 75	
TCT ATT GCC GGC AGC AAT GAG GCG GGC TGG TGC TGC GCC TGC TAC GA	452
Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Gl	
80 85 90	



GTAAGCTTTG GTCGCGTGTG TAACACTGTG CAGGCATAGC ACTAACCACC TCCCAG G 509  
u

CTC ACC TTC ACA TCC GGT CCT GTT GCT GGC AAG AAG ATG GTC GTC CAG 557  
Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln

95 100 105

TCC ACC AGC ACT GGC GGT GAT CTT GGC AGC AAC CAC TTC GAT CTC AAC 605  
Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn

110 115 120

ATC CCC GGC GGC GGC GTC GGC ATC TTC GAC GGA TGC ACT CCC CAG TTC 653  
Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe

125 130 135

GGC GGT CTG CCC GGC CAG CGC TAC GGC GGC ATC TCG TCC CGC AAC GAG 701  
Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu

140 145 150

TGC GAT CGG TTC CCC GAC GCC CTC AAG CCC GGC TGC TAC TGG CGC TTC 749  
Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe

160 165 170

GAC TGG TTC AAG AAC GCC GAC AAC CCG AGC TTC AGC TTC CGT CAG GTC 797  
Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val

175 180 185

CAA TGC CCA GCC GAG CTC GTC GCT CGC ACC GGA TGC CGC CGC AAC GAC 845  
Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp

190 195 200

GAC GGC AAC TTC CCT GCC GTC CAG ATC CCC TCC AGC AGC ACC AGC TCT 893  
 Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser  
 205 210 215  
 CCG GTC GGC CAG CCT ACC AGT ACC AGC ACC ACC TCC ACC TCC ACC ACC 941  
 Pro Val Gly Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr  
 220 225 230 235  
 TCG AGC CCG CCC GTC CAG CCT ACG ACT CCC AGC GGC TGC ACT GCT GAG 989  
 Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu  
 240 245 250  
 AGG TGG GCT CAG TGC GGC GGC AAT GGC TGG AGC GGC TGC ACC ACC TGC 1037  
 Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys  
 255 260 265  
 GTC GCT GGC AGC ACC TGC ACG AAG ATT AAT GAC TGG TAC CAT CAG TGC 1085  
 Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys  
 270 275 280  
 CTG TAA ACGCAGGGCA GCCTGAGAAC CTTACTGGTT GCGCAACGAA ATGACACTCC 1141  
 Leu  
 CAATCACTGT ATTAGTTCTT GTACATAATT TCGTCATCCC TCCAGGGATT GTCACATATA 1201  
 TGCAATGATG AATACTGAAC ACAAACCTGG CCGCTTGAAC TGGCCGAAGG AATGCC 1257

配列番号 4

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : N末端フラグメント

## 起源

生物名 : Humicola insolens

## 配列

Gln Asn Cys Gly Ser Leu Thr Thr Glu Arg His Pro Ser Leu Ser Trp

1

5

10

15

配列番号5

配列の長さ : 20

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : N末端フラグメント

## 起源

生物名 : Humicola insolens

## 配列

Val Val Glu Glu Arg Gln Asn Cys Gly Ser Ala Asp Gly Lys Ser Thr

1

5

10

15

Arg Tyr Trp Asp

20

配列番号6

配列の長さ : 21

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : N末端フラグメント

## 起源

生物名 : *Humicola insolens*

配列

Gln Asn Cys Gly Ser Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys

1                      5                      10                      15

Cys Lys Pro Ser Cys

20

配列番号 7

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : N末端フラグメント

起源

生物名 : *Humicola insolens*

配列

Gln Gln Ala Gly Ser Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys

1                      5                      10                      15

## 請求の範囲

1. フミコーラ・インソレンス由来のセルラーゼNCE 1遺伝子またはNCE 2遺伝子の制御配列を含んでなる、発現ベクター。
2. フミコーラ・インソレンス由来のセルラーゼNCE 1遺伝子またはNCE 2遺伝子の制御配列が、プラスミドpM3-1またはプラスミドpM14-1内にあるNCE 1および2の制御配列である、請求項1記載の発現ベクター。
3. 前記制御配列が、プロモーター、シグナル配列、およびターミネーターからなる群から選ばれる少なくとも一つである、請求項1または2記載の発現ベクター。
4. 前記プロモーター配列が、プラスミドpM3-1中の、NCE 1遺伝子のN末端から上流の約1500bpまでの領域中に存在する配列または高プロモーター活性を保持するその改変配列である、請求項3記載の発現ベクター。
5. NCE 1遺伝子のN末端から上流の約1500bpまでの領域中に存在する配列が、プラスミドpM3-1中のNCE 1遺伝子のN末端から上流のBg 1 IIサイトまでの配列である、請求項4記載の発現ベクター。
6. 前記プロモーター配列が、プラスミドpM14-1中の、NCE 2遺伝子のN末端から上流の約1500bpまでの領域中に存在する配列または高プロモーター活性を保持するその改変配列である、請求項3記載の発現ベクター。
7. NCE 2遺伝子のN末端から上流の約1500bpまでの領域中に存在する配列が、プラスミドpM14-1中のNCE 2遺伝子のN末端から上流のEcoRIサイトまでの配列である、請求項6記載の発現ベクター。
8. 前記シグナル配列が、配列番号1に記載のアミノ酸配列の-22から-1までの配列をコードする塩基配列もしくは配列番号2に記載のアミノ酸配列の-23から-1までの配列をコードする塩基配列、またはこれら塩基配列の改変

配列であって、シグナル配列活性を保持するアミノ酸配列をコードする塩基配列である、請求項3記載の発現ベクター。

9. 前記ターミネーター配列が、プラスミドpM3-1中の、NCE1遺伝子のC末端から下流の約1400bpまでの領域中に存在する配列またはターミネーター機能を保持するその改変配列である、請求項3記載の発現ベクター。

10. NCE1遺伝子のC末端から下流の約1400bpまでの領域中に存在する配列が、NCE1遺伝子のC末端から下流のBglIIサイトまでの配列である、請求項9記載の発現ベクター。

11. 前記ターミネーター配列が、プラスミドpM14-1中の、NCE2遺伝子のC末端から下流の約500bpまでの領域中に存在する配列またはターミネーター機能を保持するその改変配列である、請求項3記載の発現ベクター。

12. NCE2遺伝子のC末端から下流の約500bpまでの領域中に存在する配列が、NCE2遺伝子のC末端から下流のBglIIサイトまでの配列である、請求項11記載の発現ベクター。

13. 前記制御配列に作動可能に連結された目的タンパク質をコードする塩基配列を更に含んでなる、請求項1～12のいずれか一項に記載の発現ベクター。

14. 前記目的タンパク質が、セルラーゼNCE4またはそれらの改変タンパク質である、請求項13に記載の発現ベクター。

15. 遺伝子マーカーを更に含んでなる、請求項1～14のいずれか一項に記載の発現ベクター。

16. 遺伝子マーカーが薬剤耐性遺伝子である、請求項15に記載の発現ベクター。

17. 遺伝子マーカーがStreptomyces rimofaciens由来のデストマイシン耐性遺伝子である、請求項15に記載の発現ベクター。

18. 発現ベクターpMKD01、pEGD01、またはpIED02。

19. 請求項10～18のいずれか一項に記載のベクターによって形質転換された、フミコーラ属に属する微生物。

20. フミコーラ属に属する微生物がフミコーラ・インソレンスである、請求項18記載の微生物。

21. フミコーラ属に属する微生物において目的タンパク質を発現させる方法であって、

請求項19または20に記載の微生物を培養し、培養物から前記目的タンパク質またはペプチドを採取する工程を含んでなる、方法。

22. 微生物がフミコーラ・インソレンスであり、その培養液1リットルあたり4.5g以上のタンパク質を生産する、請求項21記載の方法。

23. 請求項21または22に記載の方法によって生産されたタンパク質もしくはペプチドまたはそれを含んでなる組成物。

24. 請求項21または22に記載の方法によって、発現ベクターとして発現ベクターpMKD01を用いた場合に得られる、N末端に配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する、タンパク質。

25. 請求項20または21に記載の方法によって、発現ベクターとして発現ベクターpEGD01を用いた場合に得られる、N末端に配列番号5または6に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

26. 請求項21または22に記載の方法によって、発現ベクターとして発現ベクターpIED02を用いた場合に得られる、N末端に配列番号7に記載のアミノ酸配列を有する、タンパク質。

27. プラスミドpM3-1中の、NCE1遺伝子のN末端から上流の約1500bpまでの領域中に存在する配列または高プロモーター活性を保持するその改変配列を含んでなる、プロモーター配列。

28. NCE1遺伝子のN末端から上流の約1500bpまでの領域中に存

在する配列が、プラスミド pM3-1 中の NCE 1 遺伝子の N 末端から上流の Bgl II サイトまでの配列である、請求項 27 記載のプロモーター配列。

29. プラスミド pM14-1 中の、NCE 2 遺伝子の N 末端から上流の約 1500 bp までの領域中に存在する配列または高プロモーター活性を保持するその改変配列を含んでなる、プロモーター配列。

30. NCE 2 遺伝子の N 末端から上流の約 1500 bp までの領域中に存在する配列が、プラスミド pM14-1 中の NCE 2 遺伝子の N 末端から上流の EcoRI サイトまでの配列である、請求項 29 記載のプロモーター配列。



1 / 5

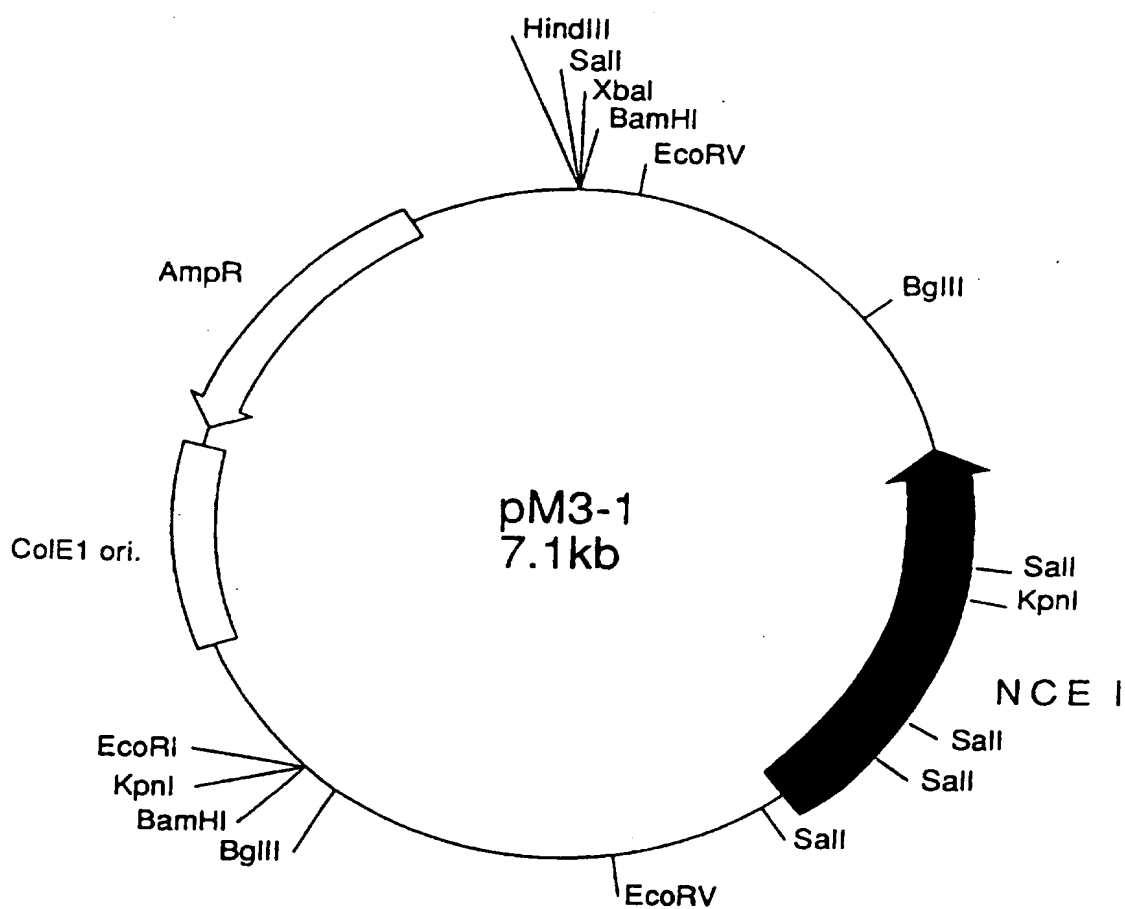


FIG. 1

2/5

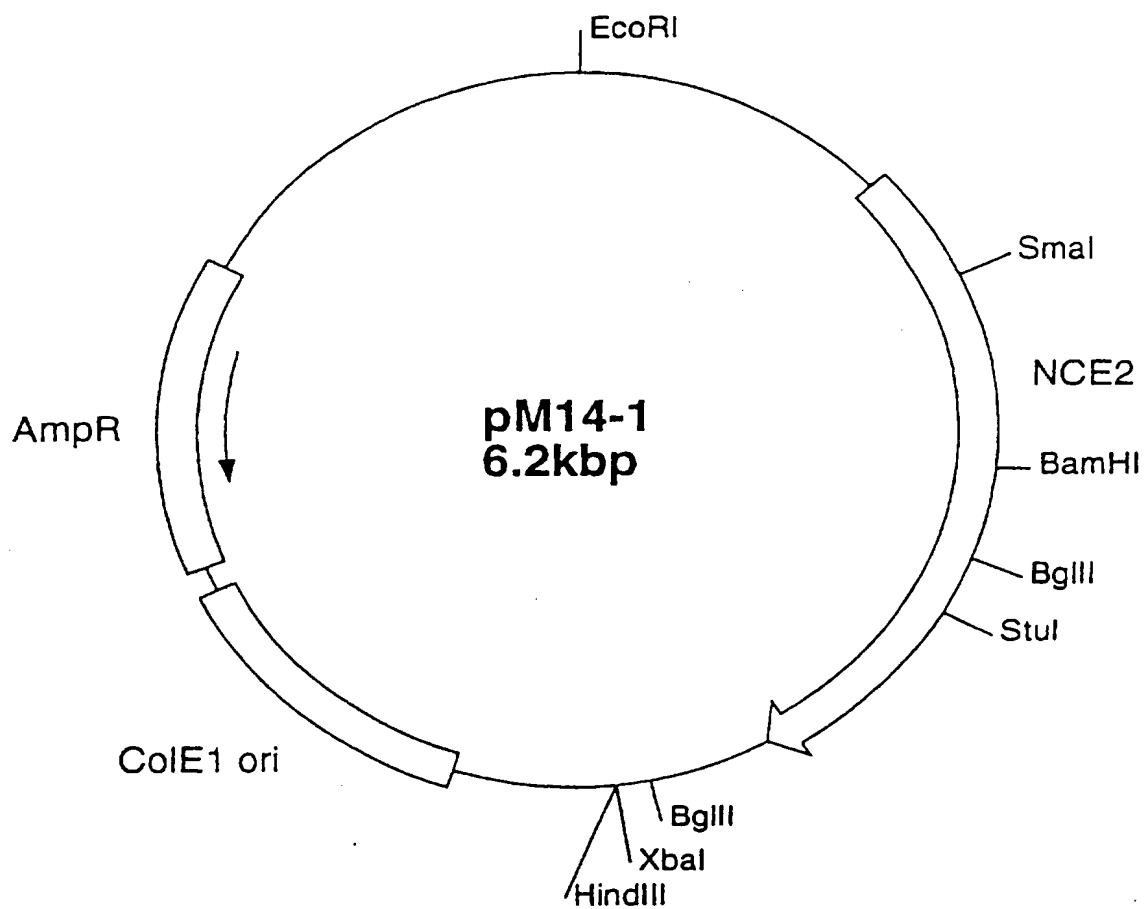


FIG. 2

3 / 5

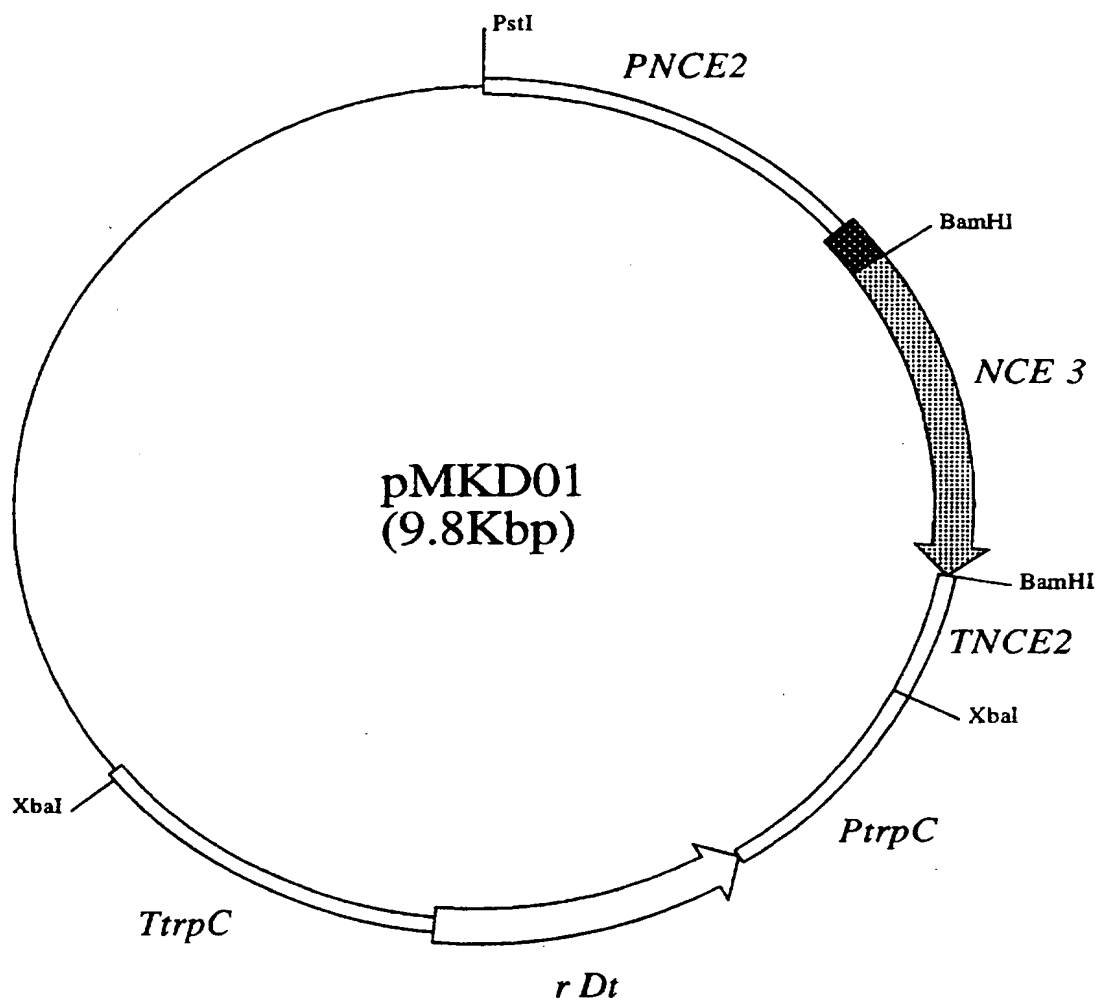


FIG. 3

4 / 5

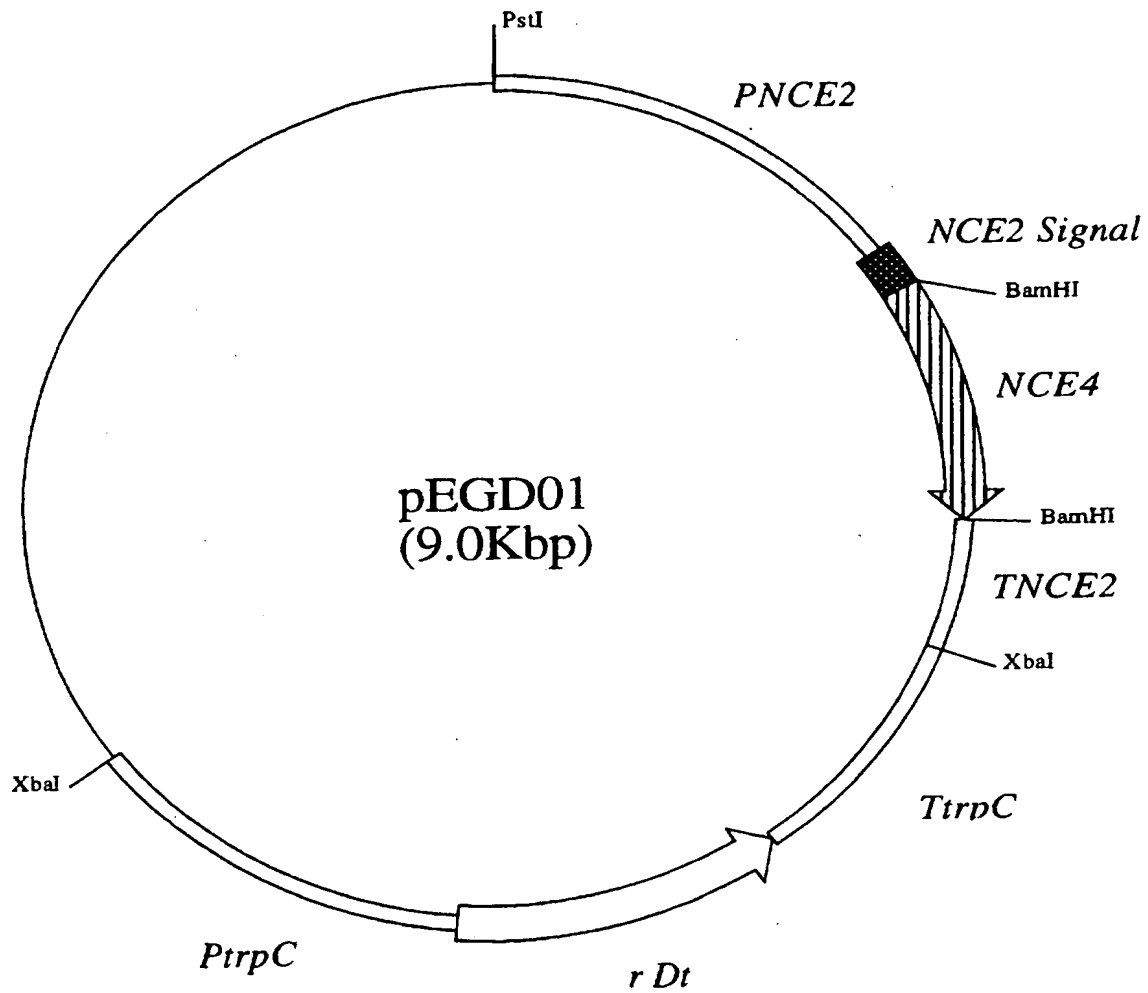


FIG. 4

5 / 5

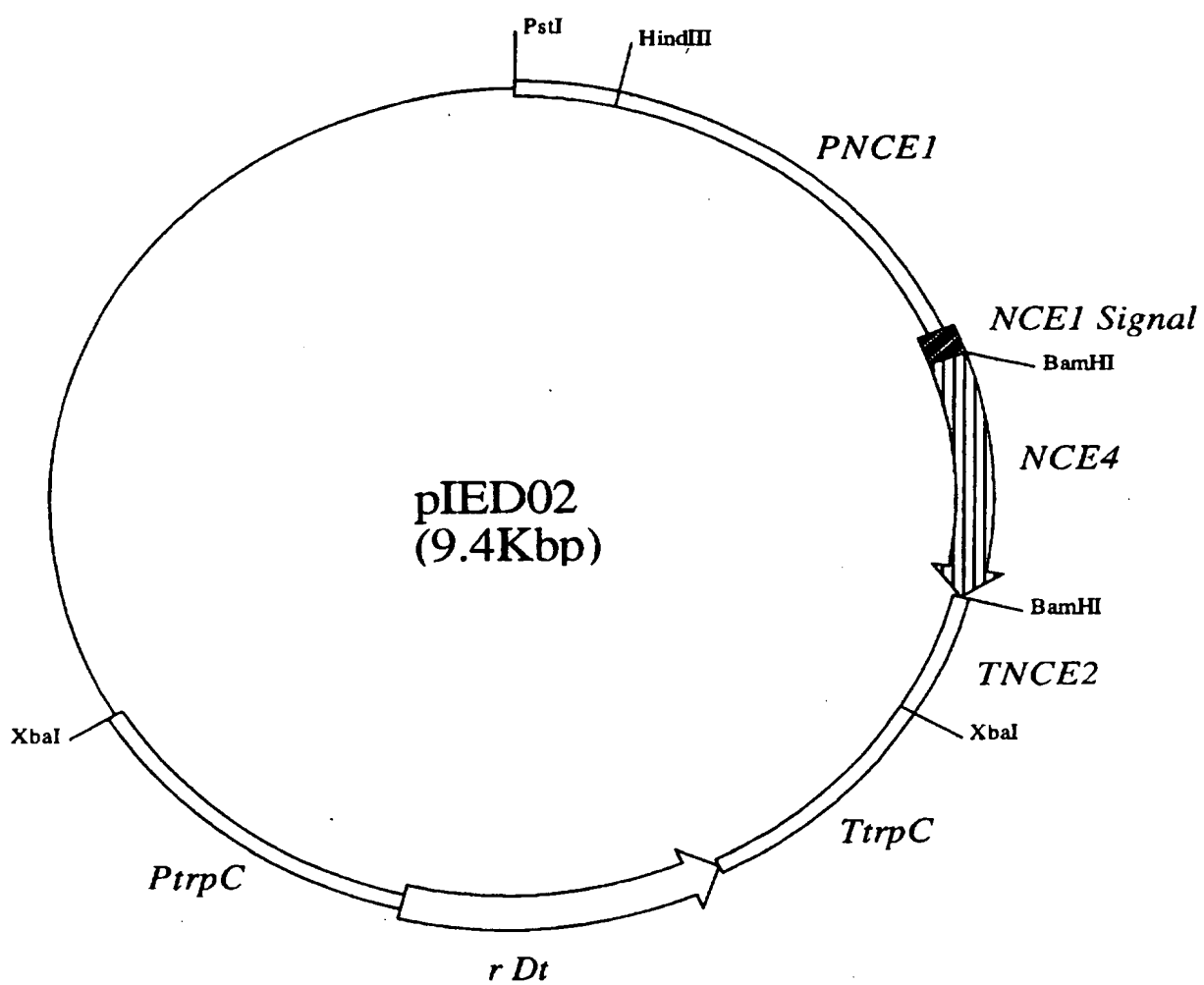


FIG. 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02560

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/74, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/74, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/37

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSYS, Genetyx

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$ A	JP, 08-056663, A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), March 5, 1996 (05. 03. 96) (Family: none)	1-5, 9-10, 13, 15-16, 19-23 <u>17</u> 8, 18, 24-30
$\frac{X}{Y}$ A	JP, 08-126492, A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), May 21, 1996 (21. 05. 96) (Family: none)	1-3, 6-7, 11-13, 15-16, 19-23 <u>17</u> 8, 18, 24-30
Y	JP, 59-175889, A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), October, 4, 1984 (04. 10. 84) (Family: none)	17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

October 16, 1997 (16. 10. 97)

Date of mailing of the international search report

October 28, 1997 (28. 10. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N15/74, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/37

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12N15/74, C12N1/21, C12P21/02, C07K14/37

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSYS, Genetix

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	J P, 08-056663, A (明治製菓株式会社) 5. 3月. 1996 (05. 03. 96) (ファミリーなし)	1-5, 9-10, 13, 15-16, 19-23 17 8, 18, 24-30
<u>X</u> <u>Y</u> A	J P, 08-126492, A (明治製菓株式会社) 21. 5月. 1996 (21. 05. 96) (ファミリーなし)	1-3, 6-7, 11-13 15-16, 19-23 17 8, 18, 24-30
Y	J P, 59-175889, A (明治製菓株式会社) 4. 10月. 1984 (04. 10. 84) (ファミリーなし)	17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 10. 97

国際調査報告の発送日

28.10.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤田 節



4 B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3449